

## 2. ウイルス第二部

部長 脇田 隆 宇

### 概 要

当部が対応するウイルスは主として消化器系疾患の原因ウイルスであり、A、B型肝炎ワクチン、経口生ポリオワクチンを検定、検査対象としている。

第1室の最重要課題は経口生ポリオワクチンの検定、検査並びに、ワクチン株であるセービン株由来不活化ポリオワクチン（sIPV）の開発推進および検定法の開発である。本年は経口生ポリオワクチンの中間バルク1件の神経毒力試験の再試験、小分製品1件の検定をおこなった。また、新たな担当ワクチンとしてロタウイルスによる胃腸炎に対するワクチンの承認前検査を開始している。承認後は製剤担当室として検定を実施する予定である。ワクチン導入前後のロタウイルスの流行状況を把握するための研究も開始している。国産不活化ポリオワクチンの早期臨床導入のためにDTP-sIPVの混合ワクチンとして開発が進んでいる。本ワクチンの開発推進にかかる業務として、国内参照品の開発及び安定性試験、検定方法の開発を引き続きおこなった。ワクチン開発の進行に伴い、国内参照品のロット更新も迅速な対応していく必要がある。

わが国の食中毒の多くの原因となっているノロウイルスに関しては、全国地研との連携が確立し、感染研はレファレンスセンターとしての機能を良く果たしている。ノロウイルスの爆発的な流行は観察されていないが、引き続き警戒が必要である。カリシウイルスに関する基礎研究が進展している。今年度は構造解析に関する研究が進んだ。治療薬や予防薬の開発につなげていきたい。

第2室はWHO世界ポリオ根絶計画に参画している。WHOの指定をうけて、世界の特殊専門ラボとして、また西太平洋地域の指定ラボとして世界各地で分離されるポリオウイルスの性状解析を続けた。今年度も西太平洋地域におけるポリオフリーの維持を確認した。JICAとの共催で実施した第20回ポリオ実験室診断

技術研修会（ポリオを含むワクチン予防可能疾患の世界的制御のための実験室診断技術研修としては第1回目）ではポリオ流行国など各国からの参加者に講義および実習を実施した。また、国内エンテロレファレンスセンターとしてレファレンス活動、依頼検査をおこなった。

エンテロウイルス71は手足口病の原因ウイルスであり、脳炎を併発することがある。このエンテロウイルス71の感染受容体として同定したヒトPSGL-1に関する解析が進んだ。さらにエンテロウイルスに対する抗ウイルス化合物を複数同定し、その標的についての解析をおこなった。環境中のエンテロウイルスサーベイランスも進めている。

第3室及び第4室ではB型およびC型肝炎ウイルスの研究をおこなった。C型肝炎ウイルス研究ではウイルスの感染複製増殖に関与する宿主因子およびウイルス因子の両面からの研究が進んだ。新たなウイルス感染増殖モデル系の構築及び新規ワクチン開発に関わる研究も進行している。B型肝炎ウイルスでは抗ウイルス活性を有する化合物を同定するための実験系を確立した。肝炎研究基盤整備事業の2年度目となり、肝炎ウイルス研究成果の情報収集・解析、研究者育成などを進めている。今年度は5回の研修会を実施し、肝炎ウイルス研究データベースを公開した。

第5室の最重要課題はA型及びB型肝炎ワクチンの検定、検査である。本年度はA型肝炎ワクチン2件、B型肝炎ワクチン6件の検定をおこなった。

A型肝炎は2010年春期に多発し、最終的には346人の患者が発生した。今後の対策にいかせるよう、この流行に関する解析を進めた。E型肝炎研究はウイルス培養が可能となり、感染性クローンも樹立できた。ウイルス学的な研究およびワクチン開発に関わる研究を進めている。

厚生科学審議会感染症分科会予防接種部会において、

予防接種法の定期接種となっていない疾病・ワクチンについての検討を進めるにあたり、ポリオワクチン(不活化ワクチン導入に向けて)とB型肝炎ワクチンに関して、現時点における情報を幅広く収集し、整理を行うことを目的としてファクトシートを作成した。

以下のような国際的技術協力をおこなった。

#### 第二室

李 岩 (中国, 山東省疾病予防控制センター) <笹川フェロー>平成22年9月3日～平成23年8月23日, エンテロウイルスの遺伝子診断の研究。

#### 第五室

Sadaf Bashir Dar (University of Delhi) 平成23年2月27日～平成23年5月18日, LAMP法によるB型肝炎ウイルス検出法の開発と応用とE型肝炎ウイルスの基礎研究。

人事面では、平成22年4月に村山麻子研究員と村上耕介研究員が就任、同年7月に第4室室長に相崎英樹氏が昇任した。新職員の皆さんの活躍に大いに期待する。

ハンスマン・グラント主任研究官は、平成20年8月より、ウイルスゲノムの組換え、および粒子構造の解析のため米国国立予防衛生研究所(NIH)に長期出張中し、平成22年8月に帰国した。

業績

調査・研究

I. 下痢症ウイルスに関する研究

1. ノロウイルス (NoV) に関する研究

(1) ノロウイルスリバーシジェネティックスシステムに関する研究

新生ウイルス粒子を産生可能なヒトノロウイルス GII/3 U201 株の完全長 cDNA pKS-U201F を用いたリバーシジェネティックスシステムを GII/4 Sagal strain, GII/4, 3 キメラウイルス株 TCH04-577 株, GI/1 Norwalk prototype virus に応用するため, U201 と同様なコンストラクションを行い, それぞれのクローンの細胞内挙動を live cell imaging, 共焦点レーザー顕微鏡, でコンボリューション蛍光顕微鏡によって確認した.

[片山和彦, 岡智一郎, 村上耕介, 脇田隆字]

(2) ノロウイルスを利用した経口ワクチン用ベクター作製の試み

経口ワクチンに特化した腸管特異的な導入が可能なベクターとしてヒトノロウイルスに加え, マウスノロウイルスを利用した遺伝子導入ベクターの作製を行った. pKS-U201F のヒトノロウイルス遺伝子領域をマウスノロウイルスと交換した pKSF-MuNoV-S7, マウスノロウイルスゲノム RNA を T7 RNA polymerase promoter で転写可能な pT7-MuNoV-S7 を構築した. インビトロで合成した MuNoV RNA は, RAW 細胞, 293T 細胞の双方で感染性 MuNoV 粒子を産生可能であった. 現在, pKSF-MuNoV-S7 の感染性を検討中である.

[中西 章(国立長寿医療研究センター), 片山和彦, 岡智一郎, 脇田隆字]

(3) ノロウイルス (NoV) のゲノム解析

2010 年 4 月~2011 年 3 月の間に全国 20 カ所の衛生研究所で収集した感染者糞便を用い, NoV 遺伝子型 GII/4 のゲノム全長の塩基配列を得た. 少なくとも 7 種の GII/4 の単系統亜株が急性胃腸炎の集団発生に関わっていた. ゲノム組換え点として, ORF1/ORF2 境界の高度保存領域を見いだした. これにより, ノロウイルスは, ヒ

トへの適応変化能力を高めていることが昨年同様に示唆された. 得られた情報は, ノロウイルスサーベランスに還元した.

[本村和嗣, 横山 勝, 中村浩美, 守 宏美, 神田忠仁, 佐藤裕徳(病原体ゲノム解析研究センター), 岡智一郎, 片山和彦]

(4) ノロウイルス GII に対する組織血液型抗原物質 (HBGA) の結合機構の X 線構造解析による研究

ノロウイルス (NoV) VLP 表面に突出する P 領域には, 様々なタイプの HBGA が結合することが報告され, HBGA は, NoV の受容体候補と考えられている. P 領域を大腸菌で発現し, 高度に生成した後, 様々な HBGA と混合して結晶を作製し, X 線結晶構造解析を行った. 改正に成功した HBGA のすべてが,  $\alpha$  1-2fucose によって P 領域に結合しており, 結合様式に差がないことが明らかになった.  $\alpha$  1-2fucose は, 腸管粘膜上のムチンに大量に存在していることが知られている. HBGA の NoV に対する不変的結合様式は, NoV 腸管粘膜へのウイルス粒子のコンタクトに重要な役割を果たしている可能性がある.

[Grant S. Hansman, Christian Biertu (NIH), Ivelin Georgiev (NIH), Jason S. McLellan (NIH), Lei Chen (NIH), Tongqing Zhou (NIH), Kazuhiko Katayama and Peter D. Kwong (NIH) ]

(5) ノロウイルス網羅的全ゲノム塩基配列解析と CaliciWeb の構築

ノロウイルス (NoV) は, 構造タンパク質領域のゲノム塩基配列を用いて, GI から GV の 5 つのグループに分類できる. このうち, 人に感染するのは GI, II, IV である. GI, GII にはそれぞれ遺伝的に異なる 14-17 種類以上の genotype が存在している. これら genotype のうち, 全長塩基配列が明らかにされているのは約 60% に過ぎない. 我々は, 全長塩基配列の明らかにされていない genotype の網羅的全ゲノム塩基配列解析を推進し, ノロウイルスの分子進化機構, 流行のメカニズム解明を推進している. さらに, NoV を含むカリシウイルスデータベース, 情報共有サイト CaliciWeb の構築し, 国内外への

塩基配列データ共有化を進めている。本年度は、6種類の genotype の全塩基配列を決定した。

[天野加奈子, 小沢一弘, 三木元博, 片山和彦, 岡智一郎, 村上耕介, 三瀬敬治 (札幌医大), 脇田隆字]

(6) ノロウイルス非構造タンパク質 p22 (3A-like protein) の機能解析

ヒトノロウイルス (NoV) の ORF1 にコードされる非構造蛋白質 3A-like protein (p22) に ER リテンションシグナル配列が存在することを明らかにした。p22 は、細胞内の小胞体からトランスゴルジ間のタンパク質の膜輸送システムに影響を与え、狭間に NoV の複製の場を形成する機能がある可能性が示唆された。

[Tyler M. Sharp (BCM), Susana Guix (BCM), Kazuhiko Katayama, Sue E. Crawford (BCM), Mary K. Estes (BCM)]

(7) ノロウイルス, サポウイルス網羅的 VLP および抗体の作製

ノロウイルス (NoV), サポウイルス (SaV) は、感染モデル動物も存在せず、培養細胞で増殖させることもできない。これらのウイルスの研究、抗原抗体検出システムの開発などにウイルス様中空粒子 (VLP) と、それを用いて作製する抗血清は、研究用ツールとして極めて有用である。当部室では、VLP と抗血清の作製を継続し、パネルを維持している。本年度は、6種類の新たな VLP, 抗血清を作製した。

[天野加奈子, 小沢一弘, 三木元博, 片山和彦, 岡智一郎, 村上耕介, 李 天成, 脇田隆字]

(8) ノロウイルス食中毒事例調査のためのシークエンスデータ共有化

ノロウイルス (NoV) の広域食中毒事例の早期探知に有効と考えられるシークエンスデータの共有化を試行的に実施する中で、同一塩基配列を持つ NoV 遺伝子型 GI.4.3 株の大阪府および大阪市からの登録から、2009年8月初旬に奈良市、大阪市および神戸市の同一居酒屋チェーン店 3 店舗で同時多発的に発生した食中毒事例を探知した。

[野田 衛(国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部), 入谷展弘(大阪市立環境科学研究所), 中田恵子(大阪府立公衆衛生研究所), 斎藤博之(秋田県環境保健研究センター), 片山和彦, 岡智一郎, 山下和予(感染症情報センター), 田中 忍(神戸市環境保健研究所), 西川 篤(奈良市保健所), 北堀吉映(奈良県保健環境研究センター), 三谷重里子(京都府山城北保健所)]

(9) 国内の下水および河川水からの Genogroup IV ノロウイルスの検出および遺伝子解析

我々はこれまでに下水、河川水中に存在する GI, GII 株の遺伝子を網羅的に解析することで、流域における流行株の把握が出来ることを示した。本年度は、下水、河川水中の GIV 株の存在状況に着目して調査を行った。2005年3月~2006年2月に採水した国内の下水処理場において流入水及び処理水、2003年4月~2004年3月に多摩川の5地点において採取した河川水を調査した結果、GIV NoV が冬期に高頻度に検出されること、遺伝的に多様な GIV 株が存在することを明らかにした。GI, GII NoV と同様、GIV NoV も冬期に流行し、さらに時期によって異なる GIV 株が流行している可能性が示唆された。

[北島正章 (東大院工学), 岡智一郎, 原本英司 (山梨大学), 片山和彦, 片山浩之 (東大院工学)]

(10) ヒトノロウイルス VLP のヒト腸管由来培養細胞への結合様式の解析

ヒトノロウイルス (HuNoV) の細胞への結合様式を詳細に解析する事を目的として、共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析を行った。ヒト腸上皮様細胞株 Caco-2 に HuNoV VLP を加えて反応させた。VLP は一様に全ての細胞に結合するのではなく、一部の細胞集団に特異的に結合することを明らかにした。また、Caco-2 での発現が知られている H1 型 HBGA に対する抗体を用いて、VLP と H1 型 HBGA の細胞における局在を解析したところ、H1 型 HBGA と VLP の局在が必ずしも一致せず、H1 型 HBGA を発現していない細胞にも VLP が結合することを明らかにした。Caco-2 には H1 以外の HBGA もしくは、未知の分子を利用して細胞に結合する可能性がある。

[村上耕介, 岡智一郎, 松田 幹 (名大院生命農学), 片山和彦]

(1 1) ノロウイルス 3C 様プロテアーゼの変異導入解析  
ノロウイルス Chiba407 株 (GI/4) の 3C 様プロテアーゼに種々の変異を導入し, Ala 置換で活性が消失したり, タンパク質発現量が低下したりする Trp6, Trp19, Thr27, Leu86, Leu95, Leu97, Met101, Gln117, Leu121, Thr134, Tyr143, Val144, Val167 の 14 残基についてさらにいくつかの変異を導入して機能への影響を見た. 既報の立体構造を考慮すると, Thr134 と Tyr143 が基質認識に重要であると考えられたほか, これら 14 残基の多くは相互作用ネットワークを形成し, 立体構造の維持, 効率的なタンパク質分解に寄与していることが示唆された.

[染谷雄一]

(1 2) ノロウイルス 3C 様プロテアーゼの C 末端領域欠失の効果

ノロウイルス Chiba407 株 (GI/4) の 3C 様プロテアーゼは 181 アミノ酸残基から成る. 本酵素の結晶構造は 173 番目残基までしか含まない. このことは C 末端領域が一定の構造をとっていないことを示唆する. 人工的に C 末端領域を欠失させ, プロテアーゼ活性への影響を見たところ, 172 番目残基以降 10 アミノ酸残基を欠失させても活性に影響はなかった. C 末端 10 アミノ酸残基は活性に必要ではないことを示している.

[染谷雄一]

(1 3) 均一な粒子径のノロウイルス様中空粒子の昆虫細胞での発現とその性質

ノロウイルス Chiba407 株 (GI/4) のキャプシド (VP1) タンパク質を Tn5 細胞で発現させると, 通常の 38 nm のウイルス様中空粒子 (VLP) の他に, 23 nm の小粒子を形成する. この VLP は 58 kDa と 52 kDa の 2 種の VP1 タンパク質から成る. アミノ酸配列解析の結果, 58k タンパク質の N 末端は Ala4 残基, 52 k タンパク質は Thr45 残基であった. Leu43-Ala44-Thr45 を Ala-Pro-Val に置換したところ, 58 kDa の単一のタンパク質が生成し, VLP の

サイズも 38 nm に均一化された. 均一な 38 nm VLP は野生型 VLP (混在型) と抗体の反応性において変化はなかった. 血液型糖鎖抗原との反応パターンに変化はなかったが, Lewis b 抗原の結合の程度が三重変異 VLP で顕著に低下していた.

[染谷雄一, 白土東子]

(1 4) NoV と血液型抗原との結合: 糖鎖遺伝子改変細胞による解析

昨年度までに, VLPs を用いた In vitro-binding assay (ELISA, Biacore) によって NoV が ABO 抗原だけでなく Lewis 抗原においてもタイプ 1, 2 構造の識別を行っていること, GII/4 遺伝子型株が, 他の遺伝子型株に比べ結合できる血液型抗原の種類が多く, またそれぞれの血液型抗原への結合力が強いことを明らかにした. 平成 22 年度は糖鎖遺伝子改変細胞を用いた解析により, 細胞上の血液型抗原においてもタイプ 1, 2 構造の識別が行われていること, GII/4 遺伝子型株の血液型抗原への結合力が強いことを確認した. NoV は血液型抗原のタイプ 1, 2 構造を識別することによって自らの組織特異性を決定している可能性がある. また, GII/4 遺伝子型株の血液型抗原への結合力の強さがこの株の伝播力の強さに結びついている可能性がある.

[白土東子, 熊谷安希子, 梅谷内晶 (産総研), 伊藤浩美 (産総研), 成松 久 (産総研), 武田直和, 石井孝司, 染谷雄一, 脇田隆字]

(1 5) NoV と血液型抗原との結合: X 線結晶構造解析による結合解析

プロトタイプ Norwalk/68 (NV/68) (GI/1) 株 は  $\alpha 1, 2$  フコース (Fuc) 転移酵素遺伝子活性型の分泌型個体で感染が成立するが, 不活性型の非分泌型個体では感染が成立しないことから, NoV と血液型抗原との結合には  $\alpha 1, 2$  Fuc が不可欠と言われている. 一方,  $\alpha 1, 2$  Fuc を含まず  $\alpha 1, 4$  Fuc を含むルイス a 抗原 (Le-a) のみを腸管上皮に発現する非分泌型個体にも感染する NoV 株が存在することが知られているが, 詳細は明らかではない. NoV の Le-a 認識機構を明らかにするため, Le-a 結合能を有する

GI/2 遺伝子型株のキャプシド P ドメインと Le-a, Le-b 複合体の X 線結晶構造解析を行った. GI/2 遺伝子型株による  $\alpha 1, 4\text{Fuc}$ ,  $\alpha 1, 2\text{Fuc}$  認識機構の詳細を明らかにした.

[熊谷安希子, 久保田智巳 (産総研), 伊藤浩美 (産総研), 古川早苗 (産総研), 成松久 (産総研), 武田直和, 石井孝司, 染谷雄一, 脇田隆字, 白土東子]

(16) マウスノロウイルス (MuNoV) の細胞内局在  
ノロウイルスの複製機構を明らかにするため, Raw264.7 培養細胞で増殖する MuNoV の蛋白質, ゲノム dsRNA (複製中間体二本鎖 RNA), nsRNA (新たに合成された RNA) の細胞内局在を蛍光デコンボリューション顕微鏡を用いて調べた. 複製に必須のポリメラーゼは核周辺部位に dsRNA と, ウイルス粒子主構成成分 VP1 蛋白質は細胞質全体に nsRNA と共局在した. MuNoV の複製は核周辺部位で, 粒子形成は細胞質で起こり, それぞれに関与する RNA 種が示唆された.

[下池貴志, 高木弘隆 (バイオセーフティー管理室), 岡智一郎, 村上耕介, 脇田隆字, 片山和彦]

(17) マウスノロウイルス (MNV) のマウス由来マクロファージ細胞での増殖性

マウスノロウイルス (MNV) の培養・増殖は主にマウスマクロファージ由来細胞株 RAW264.7 (ATCC\_TIB-81, 以下 RAW) 細胞を用いて行われている. 今回, RAW のほかにマクロファージ由来 J774A.1 (JCRB9108) 細胞での MNV 増殖を解析した. MNV の感染価は, RAW で  $6-7\log_{10}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ , J774A.1 で  $4-5\log_{10}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$  となり, 約 100 倍の差が認められた. MNV-RNA 量および, 免疫蛍光染色による観察でも同様の傾向を認めた.

[高木弘隆 (バイオセーフティー管理室), 岡智一郎, 北島正章, 遠矢幸伸, 片山浩之, 片山和彦, 杉山和良]

## 2. サポウイルス (SaV) に関する研究

### (1) サポウイルス遺伝子型タイプング法の確立

サポウイルスは 5 つ (GI, GII, GIII, GIV, GV) の遺伝子群 (genogroup) に分類され, ヒトからはこのうち 4 つ

(GI, GII, GIV, GV) の genogroup が検出されている. さらに genogroup 内には, 複数のクラスター (遺伝子型: genotype) が認められる. 本研究では, 統計解析手法に基づいたサポウイルス genotyping 法の確立を目指した. 106 株のサポウイルス構造タンパク質全長の塩基配列セットを用いて, pair-wise distance value を算出し, その相対頻度のヒストグラムに基づき, サポウイルス株のクラスターリングを行った. GI および GII はそれぞれ 7 つ, GIV および GV はそれぞれ 1 つの genotype に分類可能であった. 今後, 本方法に基づく遺伝子型タイプングが推奨される.

[岡智一郎, 原田誠也 (熊本県保健環境科学研), 飯塚節子 (島根県保健環境科学研), 植木 洋 (宮城県保健環境センター), 入谷展弘 (大阪市立環境科学研), 森 功次 (東京都健康安全研究センター), Hansman Grant, 村上耕介, 片山和彦]

### (2) 新規プライマーを用いた食用貝からのサポウイルス核酸の検出

昨年度, 環境水中のサポウイルス核酸検出を行うために新たに構築した nested RT-PCR 系を食用貝からのサポウイルス検出に応用し, 従来法より高い検出率を示すことを示した. 今後, 増幅産物のクローニングを行い, 検出株の詳細な解析を実施する.

[飯塚節子 (島根県保健環境科学研), 岡智一郎, 北島正章 (東大院工学), 片山浩之 (東大院工学), 片山和彦]

### (3) 熊本県における感染性胃腸炎の起原病原体調査とサポウイルス genogroup の年次変化

2008~2009 年度に, 熊本県内の 4 つの小児科から搬入された感染性胃腸炎患者の糞便 455 検体について, NoV, SaV, アストロウイルス (AstV), アイチウイルス (AiV), ロタウイルス (RV), アデノウイルス (AdV), エンテロウイルス (EntV) と細菌培養検査を行った. SaV 陽性の場合, キャプシド領域のシーケンスにより genogroup を決定した. SaV の系統樹解析の結果, 熊本県内では SaV genogroup の年次変化が続いていること, GI, GII 株については年度によって異なるクラスターを形成することが

示され、遺伝的に異なる SaV 株が毎年、新たに感染性胃腸炎を引き起こしていることが明らかとなった。

[原田誠也 (熊本県保健環境科学研究所), 西村浩一 (熊本県保健環境科学研究所), 清田直子 (熊本県保健環境科学研究所), 岡智一郎, 片山和彦]

#### (4) バキュロウイルススタンパク質発現系を用いたサポウイルス様中空粒子の作製

近年、急性胃腸炎の原因ウイルスとしてクローズアップされてきたサポウイルスは、いまだに培養細胞での増殖ができない。ウイルス様中空粒子を用いた我々の研究により、サポウイルスはノロウイルスと同様、多様な抗原性を有することが明らかになってきた。実用的なサポウイルス抗原検出系の開発および性能評価のためには、網羅的な抗原パネルの作製が鍵になる。そこで、本研究では、バキュロウイルススタンパク質発現系を用いてサポウイルス株についてウイルス様中空粒子の作成を試み、新たに GI 1 株, GII 6 株, GIV 1 株の作出に成功した。

[岡智一郎, 李 天成, 片山和彦]

#### (5) サポウイルス抗原検出系構築を目指したモノクローナル抗体の作出

迅速、簡便でかつ多検体検出が可能なウイルス抗原検出法を開発することを目的として、サポウイルス様中空粒子 (SaV-VLPs) に対する単クローン抗体を作製している。得られたクローンの中には各 Genogroup に特異的な単クローン抗体に加え、すべての Genogroup の株に交叉反応性を示す抗体も複数得られている。今後、これらの抗体を組み合わせ、サポウイルス抗原検出系の構築を行う。

[北元憲利 (兵庫県立大), 岡智一郎, Hansman GS, 田中智之 (堺市衛生研究所), 片山和彦]

#### (6) サポウイルス核酸検出系のための標準プラスミドの作成

ヒト由来のサポウイルスは4つの genogroup (GI, GII, GIV, GV) にわかれる。我々はすでにリアルタイム RT-PCR 用の標準プラスミドを作成し、感染症情報センターを介

して国内の配布体制を整えているが、近年の衛生研究所との共同研究において、サポウイルスの場合、ノロウイルスと異なり、年ごとに検出される genogroup が変化することが明らかになってきた。2006年に増幅産物の大きさから genogroup を判定可能な genogrouping RT-PCR 法が開発されており、簡便な検出およびサポウイルスタイプニングへの有用性が期待されている。そこで、この genogrouping RT-PCR に使用可能な GI, GII, GIV, GV 株遺伝子を組込んだ標準プラスミドを新たに作製した。今後、これらの標準プラスミドも配布準備を進める。

[岡智一郎, 片山和彦]

### 3. ネコカリシウイルスに関する研究

#### (1) ネコカリシウイルスの新規リバーシジェネティクス系の構築

ネコカリシウイルス (FCV) の複製、翻訳メカニズムの詳細はいまだ不明である。リバーシジェネティクス系は過去に構築されているが、いずれも煩雑な操作が必要、ヘルパーウイルスを必要とするなど問題点を抱えている。本年度、我々は FCV ゲノム cDNA をコードする plasmid を培養細胞に transfection するだけで FCV 感染性粒子を回収できる single step リバーシジェネティクス系の構築に成功した。本 FCV のリバーシジェネティクス系は in vitro での capped RNA の合成や、ヘルパーウイルスの細胞への感染を必要としないため、FCV 以外の因子の干渉を考慮する必要がない。今後、FCV がコードする各ウイルススタンパク質の機能評価、ゲノム複製、翻訳メカニズムの解明への寄与が期待できる。

[岡智一郎, 高木弘隆 (バイオセーフティ管理室), 遠矢幸伸 (日大獣医), 片山和彦]

### 5. カリシウイルスに関する研究

#### (1) カリシウイルスプロテアーゼ catalytic triad 形成残基のポリプロテイン切断活性への重要性

カリシウイルスのゲノムから翻訳された open reading frame 1 (ORF1) ポリプロテインは、ORF1 にコードされるプロテアーゼによって切断される。カリシウイルスプロテアーゼには catalytic triad と呼ばれる保存残基

(His, Glu or Asp, Cys)が存在する. 本研究では Norwalk virus (NoV), feline calicivirus (FCV), Sapporo virus (SaV), および Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) を用いて保存残基の重要性を検証した. その結果, 1) 共通して catalytic triad と呼ばれる His, Glu or Asp, Cys が重要, 2) NoV と FCV については Glu が必要でない切断部位も存在する, 3) 活性中心の Cys は Ser に置換できないことなどが明らかとなった. リバースジェネティクスを用いた検証結果から, ORF1 ポリプロテインの正常な切断が progeny virus 産生に必須であることが示された.

[岡智一郎, 横山 勝(病原体ゲノム解析センター), 高木弘隆(バイオセーフティ管理室), 遠矢幸伸(日大獣医), 本村和嗣(病原体ゲノム解析センター), 村上耕介, 佐藤裕徳(病原体ゲノム解析センター), 片山和彦]

(2) カリシウイルスプロテアーゼで高度に保存されているアミノ酸残基の同定および重要性の評価

カリシウイルス科のウイルスプロテアーゼはアミノ酸配列の騒動性は極めて低いが, 機能は類似している. 本研究ではプロテアーゼに保存されているアミノ酸残基を抽出し, その重要性を研究した. Norwalk virus (NoV) 32 株, feline calicivirus (FCV) 14 株, Sapporo virus (SaV) 19 株, Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) のプロテアーゼを, シャノンエントロピー解析した後, インビトロでの切断実験を行い, 保存残基を 11 か所同定した. 分子構造モデルによって, 保存残基は主にプロテアーゼ cleft 表面に存在することが明らかになった. FCV のリバースジェネティクスによる検証では, 感染性ウイルスの増殖には, 完全なポリプロテインの切断が必要であることが示唆された.

[岡智一郎, 横山 勝(病原体ゲノム解析センター), 高木弘隆(バイオセーフティ管理室), 遠矢幸伸(日大獣医), 本村和嗣(病原体ゲノム解析センター), 村上耕介, 佐藤裕徳(病原体ゲノム解析センター), 片山和彦]

## 5. ロタウイルスに関する研究

(1) 全ゲノム塩基配列解析を目的としたロタウイルス分子疫学解析手法の研究

ロタウイルスワクチンの導入前後のロタウイルスサーベイランスにより, ワクチンの効果により激変が予想されるロタウイルスの疫学情報を蓄積し, ロタウイルス感染症の予防衛生, 撲滅に関する科学的基盤情報を提供する. 特に重篤化に関与する因子を同定し, ワクチン開発, 評価システムを構築することを目標として研究を開始した. ロタウイルスは11セグメントからなる2本鎖RNAをゲノムとして有する. 全ゲノムセグメントをRT-PCRによって増幅し, 全塩基配列を解析するため, primer set のデザインを行い. 標準株として用いられる Wa 株を用いて, テストを行った結果, 良好な成績を収めた. 今後, 本プライマーセットを基準に, ヒトロタウイルスの分子疫学を行う。

[片山和彦, 村上耕介, 下池貴志, 岡智一郎, ハンスマン・グラント, 高木弘隆(バイオセーフティ管理室), 脇田隆宇]

## 6. その他

(1) 培養細胞を用いたノロウイルス, サポウイルス増殖系の検討

市販培養細胞 25 種類について, ノロウイルス, サポウイルスの増殖能を検討した. ウイルス陽性糞便を添加した後, さらに 1 回 passage した培養細胞の上清について核酸定量法でウイルス増殖の有無を検討したところ, いずれの細胞でも添加ウイルス核酸量と比較して, ウイルス核酸量が増加した細胞は認められなかった. また, 壊死を示す細胞も認められなかった.

[岡智一郎]

(2) 食品検体のノロウイルス, サポウイルス検出のためのパンソルビン・トラップ法の開発

ウイルスに対する特異抗体と黄色ブドウ球菌菌体成分複合体を用いるパンソルビン・トラップ法(パントラ法)は, 食品検体からノロウイルス, サポウイルスを検出するための実践的な手法として有用性が期待される. これまでに, ウイルス様中空粒子に対する特異抗体を用いて, その有用性を検討してきたが, 特異抗体の安定供給体制を考慮し, 市販グロブリン製剤を用いることでこの中に

含まれる抗ノロウイルス，サポウイルス抗体によって，これらのウイルスを効率的に食品中から検出できることを示した。

[斎藤博之（秋田県健康環境センター），東方美保（福井県衛生環境研究センター），田中智之（堺市衛生研究所），野田 衛（国立医薬品食品衛生研究所），岡智一郎，片山和彦]

### （3）血液製剤における HCV の不活化の検討

血液製剤における HCV の不活化の評価は実施されていない。5%アルブミン製剤に HCV を添加し，1 時間の液状加熱（一般的に 60 時間）によって検出感度以下に不活化された。一方，8%エタノール処理 4 時間では HCV は不活化されなかった。この結果はモデルウイルスであるウシ下痢症ウイルス（BVDV）と同じであった。またイムノグロブリン中（4℃保存）では HCV，BVDV 共に少なくとも 6 日間は不活化されなかった。種々の不活化法に対する HCV と BVDV の不活化効率の相違を明らかにしたい。

[下池貴志，野島清子（血液・安全性研究部），脇田隆宇，岡田義昭（血液・安全性研究部）]

### （4）弱毒ポリオウイルスセービン株由来不活化ポリオワクチンの品質管理

現在，弱毒ポリオウイルスセービン株を用いた不活化ポリオワクチン（sIPV）と沈降精製ジフテリア百日咳破傷風混合ワクチン（DPT）を混合した DPT-sIPV 4 混ワクチンが開発されている。ウイルス第二部では，平成 15 年度より DPT-sIPV 4 混ワクチンの安全性と有効性を評価するため，国内参照品の開発を行っている。今年度は，新ロット#09A の抗原量を従来品#04C，#05J の 2 倍濃度 6：200：200（Du/dose）に変更するとともに，接種量増量が標準品の安定性を評価する試験系として適当かどうか，データの蓄積，確認を行った。今後，旧ロット#05J と新ロット#09A の安定性評価，生ポリオワクチン力価を指標とした#09A の力価評価，および適切希釈倍率の検討を引き続き行う。

[白土東子，染谷雄一，柴山恵吾（細菌第二部），蒲地一

成（細菌第二部），落合雅樹（品質保証室），藤田賢太郎（品質保証室），下池貴志，岡智一郎，ハンスマン・グラント，村上耕介，片山和彦，脇田隆宇]

## II. エンテロウイルスに関する研究

### 1. 実験室診断およびレファレンス活動

#### （1）国内エンテロウイルスレファレンスセンターとしての活動

レファレンスセンターとしてエンテロウイルス標準株と標準抗血清を保管し，要望に応じて地方衛生研究所等に配付した。2010 年度は，エンテロウイルス同定用パネル血清 EP95 を 20 セット，エンテロウイルス単味抗血清 80 種類，コクサッキー A 群同定用 CF 腹水 1 セット，ウイルス標準株 9 株，等を配布した。ポリオウイルスの同定および型内株鑑別検査を行政検査として実施した。検査したポリオウイルスすべてがワクチン株であった。

#### （2）ポリオを含むワクチン予防可能疾患の世界的制御のための実験室診断技術集団研修（JICA 共催）の開催

第 20 回ポリオ実験室診断技術研修会（ポリオを含むワクチン予防可能疾患の世界的制御のための実験室診断技術研修としては第 1 回目）を実施した。研修期間は 2011 年 1 月 17 日～2 月 10 日，研修参加者は，ベトナム，アフガニスタンから各 1 名，マレーシア，パキスタン，フィリピン，ナイジェリア，エチオピアから各 2 名，中華人民共和国から 1 名の他，個別研修として中華人民共和国からの参加者 3 名の計 16 名であった。WHO ワクチン予防可能疾患実験室ネットワークにおける国家実験室に必要な技術習得のための講義及び実習を実施した。また，ポリオ根絶および麻疹排除の現状と問題点を中心とした講義および討議を行った。日本脳炎，パピローマ，ロタ等，ワクチン予防可能疾患に関する講義を実施した。

#### （3）WHO Global Specialized Polio Laboratory (GSL) としての活動

ア) National Polio Laboratory が存在しないラオス・カンボジアの National Polio Laboratory として実験室診断を行った。本年度はカンボジア 79 検体およびラオス 102 検体の AFP 由来糞便検体からポリオウイルスの分離および同定を行った。

イ) WHO GSL として、おもにカンボジア・ベトナム等で分離されたポリオウイルスについて型内鑑別あるいは塩基配列解析を行った。ポリオウイルス分離株は、すべてワクチン株であり、西太平洋地域におけるポリオフィリーの維持を確認した。

ウ) 2010 年 9 月 22-24 日に、WHO 本部(ジュネーブ)で行われた The 16th Informal Consultation on the Global Polio Laboratory Network に参加し、世界ポリオ根絶計画の現状およびポリオ実験室診断技術開発に関する情報交換を行った。

[清水博之]

エ) 2010 年 8 月 11 日-8 月 20 日に中国省級ポリオ実験室査察(寧夏回族自治区, 甘肅省)に JICA 専門家として参加した。

[吉田 弘]

(4) JICA 中国予防可能な疾患 (VPDs) プロジェクト支援

2006 年 12 月より開始した VPDs プロジェクトの後方支援(協力計画策定, 研修受け入れ)に関与するとともに、中国 CDC, 江西省 CDC, 新疆自治区 CDC : 各 1 名に対し 3 週間の研修を行った。

[吉田 弘, 有田峰太郎, 西村順裕, 清水博之]

2. 西太平洋地域の 2010 年のポリオウイルス分離状況

2010 年にラオスおよびカンボジアから送付された AFP 症例由来の糞便検体 181 検体について、ウイルス分離検査及びポリオウイルスの型内株鑑別を行なった。ベトナム, モンゴルにおいて AFP および非 AFP 検体から分離されたポリオウイルスの型内鑑別あるいは塩基配列解析を行なった。野生株ポリオウイルスおよび VDPV は検出されなかった。

[清水博之, 吉田 弘, 有田峰太郎, 西村順裕, 和田

純子, 脇田隆宇]

3. 世界ポリオ根絶計画に関わる研究

(1) 新規ポリオウイルス・エンテロウイルス検査法の開発

世界ポリオ実験室ネットワークによるウイルス学的診断では、培養細胞を用いたウイルス分離同定に基づくポリオウイルス検査を基本としているが、検査の迅速化には限界がある。そのため、糞便等の臨床検体から、直接ポリオウイルス・エンテロウイルスを検出同定する新たな検査手法が検討されているが、検体からのポリオウイルス直接検出には、検査感度・精度に関する技術的課題が多く残されている。高価な機器あるいは高度な技術を要する検査手法を用いることなく、技術レベルの異なる多くのポリオ実験室への導入が可能な簡便なウイルス検出法(RT-LAMP 法, ポリオウイルス特異的 PA 法等)に関する技術開発を試みている。

[有田峰太郎, 清水博之]

(2) ポリオウイルス同定のための新規ゼラチン粒子凝集法の開発

世界的なポリオウイルス (PV) 根絶計画の中で、小児麻痺症例を確定診断するためには急性弛緩性麻痺症例の便検体からの PV 分離・同定が必須とされている。本研究では、PV の迅速な同定を行うために、ウイルスレセプター分子を利用した新規ゼラチン凝集法の開発を試みた。その結果、PV レセプターで感作したゼラチン粒子を用いることにより、PV の迅速な同定が可能になった。この同定法は、手間および必要とされる時間の点において優れている検査系であると考えられた。

[有田峰太郎, 増島操治 (富士レビオ), 脇田隆宇, 清水博之]

(3) ポリオ生ワクチン接種率全国累積調査

全国から 5,000 人の 2 歳児を無作為に抽出し、居住する市区町村に、ポリオ生ワクチン(OPV)1 及び 2 回目, BCG, DPT1-4 回目, 麻疹・風疹混合ワクチン(MR) 1 期を接種した月齢の調査を依頼し、回収された調査

票をもとに全国累積接種率を推計した。ポリオ生ワクチンの累積接種率は1回目の接種も2回目も良好であった。OPV1回目はDPT2〜3回目とOPV2回目は、MR1期と競合していることが推測された。不活化ポリオワクチンの円滑な導入に向けて、各種ワクチンの累積接種率調査を継続する必要がある。

[高山直秀 (都立駒込病院), 清水博之, 宮村達男]

#### (4) 不活化ポリオワクチン接種者数に関する調査

OPVによる健康被害に関する一般の関心が高まるとともに、保護者の間にOPVに対する不安感が広まり、麻痺などの重篤な健康被害の可能性がないIPV接種に対する要望が増していることがワクチン関係者の間で指摘されている。このため、IPV接種の実態を把握する目的で、自治体およびIPV接種医療機関にアンケート調査を実施した。その結果、定期接種でないIPVの接種件数を自治体は把握できていないこと、IPVを個人輸入して接種している医療機関でのIPV接種件数は増加傾向にあり、接種医療機関そのものも増加傾向にあることが判明した。

[高山直秀 (都立駒込病院), 清水博之]

#### (5) 我が国の不活化ポリオワクチン導入に向けた調査・研究

ポリオワクチンに関する基本的情報について、第11回厚生科学審議会感染症分科会予防接種部会資料「ポリオワクチンファクトシート」、および、予防接種部会ワクチン評価に関する小委員会「ポリオワクチン作業チーム報告書」としてまとめ、それぞれ、2010年7月7日の予防接種防接種部会および2011年2月21日の小委員会資料として報告した。一刻も早いIPV含有ワクチンの定期予防接種への導入の必要性について結論づけるとともに、IPV含有ワクチン導入にあたっての諸課題について検討した。

[清水博之, 脇田隆字]

#### (6) 中国広東省における環境ウイルスサーベイランスによるポリオ/エンテロウイルス分離

中国広東省広州市下水処理場を定点として、環境サーベイランスによるポリオ/エンテロウイルスの地域流行像を把握することを目的とする研究を継続している。2008年4月から2010年12月までの流入下水、河川水調査を行ったところ、ほぼ毎月各型ワクチン由来株が下水から分離されており、エンテロはHEV-B群のE6, E7, E11, E12, E13, E20, E24, CB3, CB5が分離されていた。現在これらの遺伝子解析を行い、中国国内およびアジア域内の系統解析を行っている。

[Zheng Huangying (広東省 CDC), Zhang Yong (中国 CDC), 吉田 弘]

#### 4. エンテロウイルスおよびその他腸管ウイルスに関する研究

##### (1) PSGL-1のO型糖鎖付加とエンテロウイルス71結合の解析

エンテロウイルス71の受容体であるPSGL-1は、57番目のトレオニンにO型糖鎖付加を受ける。この糖鎖はシアル酸を含み、セレクトインとの結合に重要であることが詳細に解析されている。本研究では、エンテロウイルス71との結合におけるO型糖鎖の役割を解析した。トレオニンをアラニンに換え、O型糖鎖付加を阻害したPSGL-1変異体には、Pセレクトインが結合しなくなったが、エンテロウイルス71は結合した。また、PSGL-1をシアリダーゼ処理した場合も、Pセレクトインが結合しなくなったが、エンテロウイルス71は結合した。したがって、PSGL-1のO型糖鎖付加はエンテロウイルス71との結合に不要と考えられた。

[西村順裕, 脇田隆字, 清水博之]

##### (2) PSGL-1のチロシン硫酸化とエンテロウイルス71結合の解析

エンテロウイルス71の受容体であるPSGL-1には、アミノ末端領域に硫酸化を受けるチロシンが3つある。これらの硫酸化は、セレクトインやケモカインとの結合に重要である。このチロシン硫酸化のエンテロウイルス結合における役割を解析した。PSGL-1のチロシンをフェニルアラニンに置換すると、チロシンの硫酸化が

阻害された。これに伴い、エンテロウイルス 71 の結合も阻害された。したがって、PSGL-1 のチロシン硫酸化がエンテロウイルス結合に必須であると考えられた。

[西村順裕, 脇田隆宇, 清水博之]

### (3) 細胞の硫酸化阻害によるエンテロウイルス 71 増殖阻害

エンテロウイルス 71 感染における PSGL-1 硫酸化の役割を解析した。Jurkat 細胞を硫酸化阻害剤 sodium chlorate 存在下で培養しても、細胞表面での PSGL-1 発現量には影響しなかった。しかし、エンテロウイルス 71 の増殖は、sodium chlorate の濃度に依存して阻害された。したがって、Jurkat 細胞におけるエンテロウイルス 71 の増殖には PSGL-1 の硫酸化が必須であると考えられた。

[西村順裕, 脇田隆宇, 清水博之]

### (4) ヒト PSGL-1 発現マウス L929 細胞におけるエンテロウイルス 71 増殖の解析

エンテロウイルス 71 分離株 5 株を L-PSGL-1.1 細胞に感染させ、PSGL-1 依存的ウイルス増殖を解析した。ヒト由来 RD 細胞等で継代したエンテロウイルス 71 分離株 (EV71-org) では 1095 株のみ PSGL-1 依存的増殖を示したが、他の 4 株は顕著な増殖を示さなかった。一方、L-PSGL-1.1 細胞にて一度複製させたエンテロウイルス 71 (EV71-LPS1) ではどの分離株も PSGL-1 依存的に増殖した。EV71-org と EV71-LPS1 の全長のアミノ酸配列を比較したところ、4 株の EV71-LPS1 はいずれも VP2-149 にアミノ酸置換を有していた。したがって、VP2-149 におけるアミノ酸置換が L-PSGL-1.1 細胞におけるエンテロウイルス 71 の効率的増殖に関与していることが示唆された。

[宮村紘平, 西村順裕, 脇田隆宇, 清水博之]

### (5) ヒト PSGL-1 発現マウス L929 細胞に純化したエンテロウイルス 71 のヒト細胞での増殖

L-PSGL-1.1 細胞に順化し VP2-149 に変異をもつエ

ンテロウイルス 71 について、ヒト細胞での増殖性を解析した。ヒト由来である RD 細胞 (横紋筋由来)、Jurkat 細胞 (リンパ球由来)、末梢血単核球にウイルスを感染させ、3 日後までのウイルスタイターを測定した。いずれの細胞においても、VP2-149 の変異によるウイルス増殖性の違いは見られなかった。したがって VP2-149 アミノ酸はマウス細胞への感染にのみ関与するものと考えられた。

[宮村紘平, 西村順裕, 脇田隆宇, 清水博之]

### (6) エンテロウイルス 71 分離株の PSGL-1 依存的ウイルス増殖の検討

これまでの解析でエンテロウイルス 71 分離株は、PSGL-1 に結合する株と結合しない株に分類されることが明らかとなっている。PSGL-1 発現 Jurkat 細胞におけるウイルス増殖および抗 PSGL-1 抗体 KPL1 処理によるエンテロウイルス 71 増殖阻害の有無により、PSGL-1 結合株および非結合株を同定することが可能である。新たに入手した異なる genogroup のエンテロウイルス 71 分離株 (genogroup B1, B2, B5, C3) について、Jurkat 細胞における PSGL-1 依存的ウイルス増殖を検討したところ、B1 株以外は、Jurkat 細胞で PSGL-1 依存的に増殖した。エンテロウイルス 71 株の genogroup と、PSGL-1 依存的増殖には、直接的な関連性は認められなかった。

[Rifqiyah Nur Umami, 西村順裕, 清水博之]

### (7) 培養細胞でのウイルス分離過程における PSGL-1 依存性・非依存性エンテロウイルス 71 株の選択的分離の検討

臨床検体からのエンテロウイルス 71 の分離には、RD 細胞や Vero 細胞等が用いられている。これらの細胞は、PSGL-1 発現 Jurkat 細胞と比較すると、エンテロウイルス 71 受容体 PSGL-1 の発現レベルは低く、ウイルス分離の過程で PSGL-1 非依存性エンテロウイルス 71 を選択的に分離している可能性がある。ウイルス分離過程における、PSGL-1 結合性および PSGL-1 結合に関与するカプシドアミノ酸の変化を検討するため、臨

床検体そのもの、および、臨床検体を接種した後の、RD, Vero, Jurkat の各細胞における CPE 発現とカプシド遺伝子解析を行った。エンテロウイルス 71 陽性検体を接種した Jurkat 細胞では、ウイルス増殖は認められなかった。現在、RD および Vero 細胞におけるウイルス増殖と受容体依存的ウイルス variant の選択的分離およびカプシド遺伝子変異の有無について検討を行っている。

[Rifqiyah Nur Umami, 西村順裕, 清水博之]

#### (8) ヒト中枢神経組織におけるエンテロウイルス 71 受容体発現の解析

PSGL-1 等エンテロウイルス 71 受容体分子の局在・分布と神経病変との関連性を解析することにより、エンテロウイルス 71 脳炎を含む手足口病流行における神経病原性発現の分子機構を明らかにすることを目的として、急性エンテロウイルス 71 脳髄膜炎患者の中枢神経組織における、特異的エンテロウイルス 71 受容体分子の組織分布を解析する。エンテロウイルス 71 脳炎患者および対照例の中枢神経組織を用いて、エンテロウイルス 71 抗原、組織病変と PSGL-1 および SCARB2 受容体分子の分布・局在および病理学的特徴についての比較解析を行っている。

[Ong Kien Chai, Wong Kum Thong (マラヤ大学), 小池智(東京都医学総合研究所), 永田典代(感染病理部), 西村順裕, 清水博之]

#### (9) 手足口病, ヘルパンギーナ, および関連合併症の入院症例に関する全国調査

手足口病, ヘルパンギーナ, および関連合併症による入院症例の臨床疫学像を把握するために全国調査を実施している。一次調査により、全国の入院症例数および死亡症例数を推計し、二次調査により、各症例の臨床症状, 検査値, 病原検索結果などの詳細情報を収集する。一次調査では、小児科を標榜する全国の病院の小児科から、病床別に層化無作為抽出法で抽出した 750 診療科を対象とした。2010 年 4 月～9 月までの間に入院した 15 歳未満の日本人で、症例定義に一つで

も合致する症例について、入院症例数および死亡症例数の報告を依頼した。2011 年 2 月現在、392 診療科 (52.3%) から回答を得た。報告症例数は 748 症例で、うち死亡症例数は 4 例であった。一次調査の終了後、二次調査を行い、各症例の特性について情報を収集し、手足口病, ヘルパンギーナ, および関連合併症による入院症例の臨床疫学像を明らかにする。

[福島若葉(大阪市立大学), 中野貴司(川崎医科大学), 清水博之]

#### (10) 新規抗エンテロウイルス化合物の同定

ワクチンが開発されていないエンテロウイルス 71 (EV71) および生ワクチンの副作用が問題となっているポリオウイルス (PV) について、抗ウイルス薬は感染の予防および治療の有効な手段となることが期待される。大規模化合物ライブラリーを用いたスクリーニングにより、EV71 および PV に対して阻害活性を示す化合物 T-00127-HEV1 を同定した。また、T-00127-HEV1 が、宿主タンパク質 PI4KB に対する特異的阻害剤であることを明らかにした。

[有田峰太郎, 小島宏建 (東京大学創薬オープンイノベーションセンター), 長野哲雄 (東京大学創薬オープンイノベーションセンター), 岡部隆義 (東京大学創薬オープンイノベーションセンター), 脇田隆宇, 清水博之]

#### (11) 中国山東省における環境ウイルスサーベイランスにて検出された Echo6 型について

山東省 CDC との共同研究にて 2008 年 2 月より継続して主として下水を材料としてエンテロウイルスの分離を行っている。2008-10 年の間に下水由来 E6 が 30 株分離されたがそのうち 29 株は 2010 年の夏に分離された。VP1 領域の塩基配列を解析したところ 2 つのグループに分かれている。1998 年以降の分離年代の明確な患者由来株の塩基配列とともにベイズ法による進化速度および分岐年代推定を試みた。その結果、進化速度は  $7.047 \times 10^{-3}$  塩基置換/年と推定され、環境株は 2003 年と 1992 年頃に分岐して現れたと推定された。

継続的に環境サーベイランスを行い、塩基配列を解析することでヒト集団のエンテロウイルスの進化について知見が得られると考えられる。

[Tao Zexin (山東省 CDC), ZhangYong (中国 CDC), 吉田 弘]

#### (12) セレン欠乏マウスモデルによるエンテロウイルス 71 病原性の解析

必須微量元素の一つであるセレンの欠乏条件下でのウイルス遺伝子変異誘導による病原性発現の可能性を検証するため、セレン欠乏マウスモデルにおけるエンテロウイルス 71 感染モデルを樹立した。妊娠マウスの妊娠初期よりセレン充足あるいは欠乏餌を与えて飼育し、仔の出生後、通常に離乳し、離乳後も親と同じ餌で給餌を続ける。中枢神経組織を含めた各種臓器におけるセレン濃度およびグルタチオンペルオキシダーゼ活性、等を測定してマウスモデルにおける欠乏状態を評価した。母親マウスがセレン欠乏餌を食べ続けた場合、その仔マウスの肝臓、及び脳中セレン濃度がセレン充足餌を食べ続けた場合よりも低くなることが確認された。脳、及び肝臓のグルタチオンペルオキシダーゼ活性は、セレン充足餌を与えた 25 日セレン欠乏餌を与えた 25 日齢マウスは、有意に低かった。EV71 感染実験を行い、セレン欠乏および充足条件下での病原性発現およびウイルス増殖について比較解析を行った。

[小林紗弥加, 渡辺知保(東京大学), 清水博之]

#### (13) 無菌性髄膜炎を疑う熱性痙攣小児患者からのエンテロウイルスの検出

無菌性髄膜炎患者からはエンテロウイルスが検出される例が多い。エンテロウイルスは、年によって流行する血清型が入れ替わり、地域によっても流行型に差が見られる。無菌性髄膜炎患者の髄液中から B 群エンテロウイルスが高頻度に検出され、その起因ウイルスと考えられているが、他群のエンテロウイルスが検出されることがある。2008 年 4 月～2010 年 10 月迄の無菌性髄膜炎を疑う熱性痙攣小児患者を対象として患者

の髄液、咽頭ぬぐい液、便からエンテロウイルス CODEHOP PCR 法を用いてウイルス検出を試みた。CODEHOP PCR 法で 164 検体から 33 検体陽性(20.1%)となり、髄液検体からコクサッキーA9 検出された。他の陽性検体では咽頭ぬぐい液と便から主に A 群エンテロウイルスが検出された。

[町田早苗 (埼玉医大), 西村順裕, 清水博之]

#### (14) コクサッキーB 群ウイルスの腫瘍溶解性の検討

近年ウイルス自身が本来有する腫瘍溶解性を利用した、腫瘍溶解ウイルス療法が注目されてきており、腫瘍溶解性アデノウイルスもしくは単純ヘルペスウイルスを用いた臨床研究が進められている。新たな腫瘍溶解ウイルス療法の開発を目的に、RNA ウイルスであるピコルナウイルス科のエンテロウイルス属に着目して、これまでに約 40 種類のウイルスを各種ヒト癌細胞株(非小細胞肺癌, 大腸癌, 乳癌, 膵癌, 腎癌, 子宮頸癌, 前立腺癌, 線維肉腫, 白血病)及び腎臓, 肺および骨髄ストローマ正常細胞に *in vitro* で感染させ、それらの抗腫瘍効果について比較検討した。その結果、コクサッキーウイルス B 群ウイルスが、正常肺線維芽細胞を障害することなく、低い感染力価によっても肺癌細胞を特異的に溶解することを発見した。マウスモデルを用いた抗腫瘍活性について検討を進めるとともに、コクサッキーB 群ウイルスによる腫瘍溶解ウイルス療法の有効性・安全性および抗腫瘍メカニズムについて解析を進めている。

[宮本将平, 井上博之, 谷憲三朗(九州大学), 清水博之]

#### (15) ヒトラインウイルスの高感度検出法

冬期普通感冒の主要な原因ウイルスであるヒトラインウイルス(HRV)の CODEHOP VP1 RT-snPCR 法による検出同定について検討を行った。100 の血清型が存在する HRV-A 及び HRV-B に属するウイルスのうち、供試した標準株 48 株は全て検出同定が可能であった。Sequencing 用 primer には reverse 側 primer の AN88

が効果的であった。感冒症状を呈した患者由来材料 238 検体から本法によりヒトのエンテロウイルス属に属するウイルス 185 株が同定された。185 株のうち、ヒトエンテロウイルス A (HEV-A) 及び HEV-B に属するウイルスが 181 株、HRV に属するウイルスが 4 株であった。4 株の HRV は、何れも培養細胞では分離不可能とされ、最近新たに分類された HRV-C に属するウイルスで、4 株中 3 株が下気道炎患者から検出された。臨床検体から HRV-C も検出同定可能であったことから、迅速高感度な本法は、HEV のみならず HRV の検出同定にも有用である可能性が示唆された。

[吾郷昌信(長崎県環境保健研究センター), 西村順裕, 清水博之]

#### (16) ヒトカルジオウイルス国内分離株の遺伝子解析

近年、カルジオウイルス属に分類される新たな腸管ウイルス(Saffold virus)の検出が世界各地で報告されている。日本でも、この新たなヒトカルジオウイルスの検出が、最近報告されているが、我が国における伝播実態と特定疾患への関与は明らかでない。高知県で、無菌性髄膜炎および手足口病患者より分離された不明ウイルス 2 株について、Saffold virus 3 型に近縁であることが示唆された。また、病原体サーベイランス由来検体から、Saffold virus 2 型株も検出・分離された。Saffold virus 分離株は、LLC-MK2 細胞および HeLa 細胞において CPE の発現を伴って増殖したが、他のヒト細胞では顕著なウイルス増殖は認められなかった。

[細見卓司(高知県衛生研究所), Naeem Asif, 清水博之]

#### (17) パキスタン・アフガニスタンの急性弛緩性麻痺患者糞便検体からのヒトカルジオウイルスの検出と遺伝子解析

近年、カルジオウイルス属に分類される新たな腸管ウイルス(Saffold virus)の検出が世界各地で報告されている。パキスタンにおける AFP サーベイランス

により採取された糞便検体のうち、パキスタン NIH にてポリオウイルスおよびエンテロウイルスを検出した糞便検体以外の検体から、Saffold virus 遺伝子検出およびウイルス分離を試みた。Saffold virus 特異的 RT-PCR およびリアルタイム PCR システムにより、Saffold virus 遺伝子が高頻度に検出された。LLC-MK2 細胞および HeLa 細胞を用いたウイルス分離を試みたところ、多数の CPE 因子が検出されたが、解析の結果、ほとんどが非ポリオエンテロウイルスによる CPE であることが示された。糞便中の Saffold virus は、LLC-MK2 細胞および HeLa 細胞における増殖効率が低く、通常的手法ではウイルス分離は困難であることが明らかとなった。糞便中から直接 Saffold virus 遺伝子を増幅し、遺伝子解析を行ったところ、これまでに報告されている以上に多様な遺伝子型(11 genotypes)の Saffold virus の存在が明らかとなった。Saffold virus は、ヒト腸管ウイルスとして広範に伝播していることが示唆された。今後、より詳細なウイルス学的解析が必要とされる。

[Naeem Asif, 西村順裕, 清水博之, Syed Sohail Zahoor Zaidi (パキスタン NIH)]

#### (18) ヒトカルジオウイルス(Saffold virus)感染性クローンの作製

高知県で分離された髄液からの臨床分離株 JPN08-404 (SAFV type 3) を材料として、RT-PCR により得たゲノム全長を含む SAFV cDNA クローン(pSAF404)を作製した。pSAF404 由来 RNA の感染性を確認するために、HeLa 細胞にトランスフェクションして SAFV を産生させた。pSAF404 を鋳型として、T7 RNA polymerase により感染性 RNA の合成を行ったが、得られる転写産物は、完全長 RNA を含まない短鎖化された RNA であった。その原因として、SAFV ゲノム上に存在する human preproparathyroid hormone (PTH) シグナル相同配列の関与が示唆されたことから、PTH シグナルの影響を受けない CUGA 7 RNAP を用いて RNA 合成を行ったところ、完全長 RNA の合成が確認され、さらに、PTH シグナルを欠損させることで、一般的な T7

RNAPでも完全長RNAが合成された。CUGA 7 RNAPで合成したRNAは、HeLa細胞へのトランスフェクションによりSAFVを産生したことから、感染性RNAであることが確認された。

[姫田敏樹, 大原義朗(金沢医大), 細見卓司(高知県衛生研究所), Naeem Asif, 清水博之]

#### (19) 新規カルジオウイルスの病理学的診断法に関する研究

新規ヒトカルジオウイルスの病理学的診断法を確立することを目的として、陽性参照標本の作製とウイルス抗原検出のための免疫組織化学法に用いる抗体の検討を行った。その結果、ヒトカルジオウイルス(Saffold virus)脳内接種後の乳のみマウス脳組織標本では、抗脳心筋炎ウイルス(EMCV)抗体を用いて抗原検出が可能であることが判明した。感度、特異性の向上のために抗ヒトカルジオウイルス抗体の作製を予定している。

[小谷 治, 永田典代(感染病理部), Naeem Asif, 清水博之]

#### (20) 日本, タイ, スリランカの小児のヒトパレコウイルスによる急性下痢症

急性下痢症の原因ウイルスとしてのヒトパレコウイルス遺伝子の検出を試みた。小児を中心としたウイルス性下痢症と思われる検体の8~15%の頻度でヒトパレコウイルス遺伝子が検出された。1~14 遺伝子型の中で1~4型の頻度が高かったが、10型および11型をスリランカで見出した。タイ, スリランカでは最初の報告である。とくに、スリランカで10, 11型を見出したように多様なヒトパレコウイルス遺伝子型が見出された。

[牛島廣治(日本大学), 清水博之]

#### 5. ポリオウイルスのバイオセーフティ及びバイオセキュリティシステムに関する調査研究

(1) 日本におけるポリオウイルス野生株保有状況  
世界的ポリオ根絶達成およびその後のOPV接種停止

を視野に入れ、WHOは「野生株ポリオウイルスの実験室封じ込めに関する世界的行動計画」を策定し、全世界で統一された基準の下、ポリオウイルス野生株の実験室封じ込めを進めることを、すべての加盟国に求めている。我が国では、西太平洋地域における野生株ポリオウイルス伝播の終息を受け、2000-2002年にかけて大規模かつ広範な野生株ポリオウイルス保有施設調査が行われたが、調査票の全体的な回収率が低く、調査精度とその後のフォローアップに関する多くの問題点が指摘されていた。2000-2008年における各種の野生株ポリオウイルス保有施設調査により得られた情報を、厚生労働省と国立感染症研究所により集計・評価し、野生株ポリオウイルス感染性材料を保有する可能性のある施設をリストアップしたうえで、所管省庁の了解のもと各施設に対し保有状況調査を実施し、野生株ポリオウイルス感染性材料保有施設を特定した。保有施設リストを含む野生株ポリオウイルス実験室封じ込め第一段階最終評価報告書を作成しWHO西太平洋地域ポリオ根絶認定委員会に提出した。2008年12月、WHO西太平洋地域全体の野生株ポリオウイルス実験室封じ込め第一段階調査完了が宣言されたが、保有施設リストのアップデート継続している。

[小松俊彦, ルナール純子, 斎藤真紀(バイオメディカルサイエンス研究会), 清水博之]

#### (2) ポリオ野生株ウイルスの封じ込め対策に関する調査

野生株あるいはワクチン由来ポリオウイルス実験室状況に関する研究を行った。野生株ポリオウイルス実験室封じ込め第一段階最終評価WHO報告書を提出した2008年調査以降における、新たな野生株ポリオウイルス保有実態の把握のため、2007年から2010年までの4年間におけるポリオウイルス保有状況の変動の有無について、ポリオウイルスに関連するテーマで発表された研究論文について文献検索を行った。医中誌由来51報のポリオウイルス関連原著論文から同一著者を除外すると36名、他方PubMed由来62報からは48名が選択された。ポリオウイルス保有の可能性を持つ

可能性がより高い研究者として、医中誌由来研究者 36 名のうちから 3 名、PubMed 由来 48 名のうちからは 3 名、計 6 名が候補者として抽出された。

今回調査 (2007-2010 年) の 6 名を前回調査 (2006 年まで) の 12 名と照合すると、前回から継続してリストアップされた研究者は 1 名のみで、他の 5 名はポリオウイルスに関わる新たな研究者と見なされた。5 名のうち 4 名の所属は既に前回の調査時にリストアップした研究機関であり、残り 1 名は今回の調査によって新たに特定された研究機関に所属していた。

[小松俊彦, ルナル純子, 斎藤真紀 (バイオメディカルサイエンス研究会), 清水博之]

## 6. その他

平成 22 年度は 8 件の行政検査依頼があり、ウイルス分離同定、塩基配列解析等による型内株鑑別試験等を実施した。型内鑑別あるいは塩基配列解析を行ったポリオウイルスは、すべてワクチン株と同定された。

## III. 肝炎ウイルスに関する研究

### 1. A 型肝炎ウイルス (HAV) に関する研究

#### (1) スリランカの A 型肝炎流行における疫学調査

2010 年 1 月-5 月の間にビクトリー・ミリタリー・ホスピタル (スリランカ軍病院) を受診した急性肝炎患者血清 125 検体について A 型肝炎ウイルス (HAV) -IgM による確定診断を行った。また、51 検体について遺伝子解析、患者発症前の任務地、受診日から HAV 流行パターンを解析した。125 人中 119 人が HAV-IgM 陽性であった。遺伝子型は IA 35 人、IB 1 人、IIIA 15 人であった。IA のうち 27 人の患者から検出された HAV-genome は高い相同性を示し同一株の流行が示唆された。この株の患者 22 人の任務地と発症日の関係を見ると、最初に 1 人がトレーニングセンターで発症し、約一ヶ月後 (HAV の潜伏期間と一致) 同センターで 7 人が発症した。更に一ヶ月後、軍事作戦地域の 9 駐留地で A 型肝炎患者が確認された (14 人)。これは、トレーニングセンターという人口密集地での流行、更に潜伏期間中の兵士の移動に伴う流行の拡散が疑われ

た。

[清原知子, Dahanayaka N (スリランカ・Rajarata 大学), 佐藤知子, 石井孝司, 脇田隆字]

#### (2) HAV 増殖阻害に関する研究

広範囲の RNA/DNA ウイルスに対して増殖阻害効果を示すアマンタジンと、インターフェロン  $\alpha$ , および両者を同時に感作させた場合の HAV 増殖阻害効果を HAV KRM003 株と GL37 細胞を用いた *in vitro* 実験系で検討した。HAV の増殖は各薬剤単独よりも共感作させることによってより強く阻害された。

[清原知子, 神田達郎 (千葉大学大学院), 石井孝司, 脇田隆字]

#### (3) 2010 年春季に日本で多発した A 型肝炎の分子疫学的解析

日本での A 型肝炎患者数は 2007 年以降非常に低いレベル (150 人/年程度) で推移していたが、2010 年は 3 月から全国各地で A 型肝炎が多発し、最終的には 346 人の患者発生を見た。全国の地方衛生研究所と共同で、A 型肝炎患者の糞便または血清から HAV ゲノムの配列を決定し、流行状況を分子疫学的に解析したところ、流行株は genotype IA の 2 つのクラスターと IIIA の 1 つのクラスターに大部分が分類されることが判明した。本年に A 型肝炎が多発した理由は、従来日本に土着していた株 (GIA) に加え、別の新たな GIA 株が日本に侵入し、また韓国で大流行した株 (GIIIA) も一部日本に侵淫してきたためであると考えられた。

[石井孝司, 清原知子, 吉崎佐矢香, 佐藤知子, \*島田智恵, \*中村奈緒美, \*多田有希, \*\*野田 衛, 脇田隆字 (\*感染症情報センター, \*\*国立衛研食品衛生管理部), 他 26 地方衛生研究所との共同研究]

#### (4) 2010 年 A 型肝炎流行の血清疫学的解析

2010 年 3 月からの A 型肝炎流行をうけて、2010 年の患者発生状況と年齢別抗体保有率との相関を検討した。A 型肝炎は予後良好な疾病であるが、高齢者は若年者に比べて重症化することが知られている。日本で

は抗 HAV 抗体保有率の低下と感染リスクの増大、患者の高年齢化に伴う重症例の増加が危惧されてきた。今期の流行では 50 代以上の患者割合が増加し、40-60 代で死亡 1 例を含む 6 例の劇症患者が報告された。患者は抗体保有率が低い世代のうち、20-60 代に集中していた。若年齢層は不顕性感染の割合が高いため報告数が少なかったと考えられた。抗体保有率が高い 70 歳以上の患者は少なかった。今後さらなる抗体保有率の低下と患者の高齢化が予測されるため、積極的な検査態勢と予防推進が望まれる。

[清原知子, 多田有希 (感染症情報センター), 野田 衛 (国立医薬品食品衛生研究所), 石井孝司, 脇田隆字]

#### (5) A 型肝炎検査態勢の構築

これまで A 型肝炎は感染症発生動向調査の病原体サーベイランスの対象に入っていなかったため、積極的な検体確保及び検査は実施されなかった。しかし、2010 年度の A 型肝炎患者増加と厚生労働省から各自治体宛に発出された「A 型肝炎発生届受理時の検体の確保等について(4月26日)」に対応して、当室では各地方衛生研究所の検査サポート体制および自治体からの患者検体受付・検査システムを構築した。検査サポート体制は電話やメールによる質問対応、検査用プライマー・陽性コントロールの分与などを行った。検体の受付は 4 月 27 日から開始し、133 検体を受理した。結果については当該自治体及び NESFD(食中毒調査支援システム)内に設けられた V-Nus Net Japan にフィードバックし、情報の共有化を図った。

[清原知子, 多田有希 (感染症情報センター), 野田 衛 (国立医薬品食品衛生研究所), 石井孝司, 脇田隆字]

## 2. B 型肝炎ウイルス (HBV) に関する研究

### (1) HBs 抗体陽性患者に出現した HBV Escape Mutant の解析

HBs 抗体が高力価であるにもかかわらず HBV DNA 量が増加し肝障害を起こす症例があり、出現した HBV 株の遺伝子配列の解析について依頼された。そこで、Escape Mutant が疑われる 3 症例の血清より DNA を分

離し、PCR により HBs 抗体の抗原領域を増幅し塩基配列を決定した。その結果、全ての症例の HBV 株で抗原領域に変異を認め、その変異はこれまでに報告されている Escape Mutant に認められる変異と一致していた。すなわちこれらの症例で出現した HBV 株は Escape Mutant であると考えられた。

[永濱裕康 (熊本大学), 杉山奈央, 加藤孝宣, 脇田隆字]

### (2) ファクトシートの作製

厚生科学審議会感染症分科会予防接種部会において、予防接種法の定期接種となっていない疾病・ワクチンについての検討を進めるにあたり、各疾病、検討対象となったワクチンについて現時点における情報を幅広く収集し、整理を行うことを目的としてファクトシートの作製が決まった。B 型肝炎ワクチンも対象となり、そのファクトシートを作製した。原案は当部で作製し、臨床・疫学分野等の有識者の意見を反映させた。  
(<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000000bx23.html> 及び <http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r98520000014wdd.html> にて公開)

[清原知子, 石井孝司, 脇田隆字]

### (3) B 型肝炎ワクチンの試験管内試験法の検討

B 型肝炎ワクチンの in-house Inhibition ELISA を構築した。In-house Inhibition ELISA は Binding ELISA に比べると、アジュバント除去操作が不要で簡便である。しかしながら、国内参照品をリファレンスとした *in vitro* 相対力価は製造所ごとに偏り、各製剤の特性を考慮した自社参照ワクチンが必要である点は Binding ELISA と同様の結果になった。また、一次抗体が異なると同じワクチンでも相対力価が異なるため、一次抗体を選択する際に注意が必要である。in-house Inhibition ELISA をワクチンの国家検定および自社検定に応用するためには試薬も含めた標準化が必要である。

[清原知子, 石井孝司, 脇田隆字]

#### (4) HBV 粒子産生を変化させる低分子化合物のスクリーニング

HBV 産生培養細胞株を用いて、HBV 粒子産生を変化させる低分子化合物のスクリーニングをおこなった。その結果、現在までに約 150 のヒット化合物を得ており、この中には核酸アナログなど HBV ポリメラーゼを阻害する可能性がある化合物も含まれているため、スクリーニング系として有用であることを確認している。現在得られた化合物を用いた機能解析をおこなっている。

[渡士幸一, 内田奈々子, 脇田隆字]

#### (5) HBV 誘導産生細胞のクローニング

HBV を誘導的に産生可能な細胞株の単一細胞クローニングをおこなった。各細胞クローンの培地中に放出される HBV DNA をリアルタイム PCR により測定したところ、HBV DNA 放出量のさまざまなクローンを得たことが判明した。これらはそれぞれラミブジン処理により HBV DNA 放出が劇的に減少することから、化合物スクリーニングや各種機能解析に有用であると考えられた。

[渡士幸一, 脇田隆字]

#### (6) HBV 生活環後期過程を評価する実験系の構築

HBV 生活環の中で転写以降の生活環後期過程を解析するために、今回、1) キャプシド形成、2) RNA/キャプシド会合、3) DNA 合成、4) 放出、等の各生活環ステップの活性を評価する系を構築した。これらを用いて現在抗 HBV 効果をもつ化合物の評価等をおこなっている。

[渡士幸一, 内田奈々子, 溝上雅史 (国際医療研究センター), 脇田隆字]

#### (7) HBV 吸着, 侵入等初期過程を評価する実験系の樹立

HBV 生活環の中で吸着, 侵入等の初期過程を評価する実験系, 検出系を構築した。この系において、これまでに HBV 吸着を抑制することが報告されているヘパ

リンやポリリジンが HBV 感染を阻害することが確認されたことから、本系は HBV 感染, 特に生活環初期過程の評価系として有用であると考えられる。

[渡士幸一, 脇田隆字]

### 3. C 型肝炎ウイルスの研究

#### (1) 遺伝子型 2b のウイルス産生系の構築

培養細胞で効率よく増殖し、感染性ウイルスを産生できる HCV 遺伝子型 2b のウイルス株は未だ存在しない。そこで遺伝子型 2b のウイルス株を用いて JFH-1 株とのキメラを作製した。長期培養により得られたコア領域の適応変異に加えて、5' UTR, NS3 ヘリカーゼ領域, NS5B 領域, 3' UTR を JFH-1 株に置換することにより、遺伝子型 2b の株は培養細胞で増殖し、感染性ウイルス粒子を産生できるようになった。

[村山麻子, 加藤孝宣, 脇田隆字]

#### (2) 培養細胞で非増殖型のウイルス株を増殖型にする変異の同定

培養細胞での増殖がみられない HCV J6CF 株を増殖可能なウイルスに改変するために必要な点変異の同定を試みた。ウイルス RNA を導入した細胞を長期に培養することにより、NS4A 領域に適応変異が得られた。J6CF 株にこの適応変異と、NS5B 領域, 3' UTR 領域の JFH-1 株型の変異を導入することにより、J6CF 株の全長 RNA は自律的に複製し、感染性ウイルス産生が可能となった。

[村山麻子, 加藤孝宣, 脇田隆字]

#### (3) HCV プロテアーゼのウイルスの生活環における役割の解析

HCV のプロテアーゼはウイルス複製に必須であるだけでなく、宿主の蛋白質を切断し、自然免疫シグナルを押さえることにより、ウイルスが増えやすい環境を作り出している。JFH-1 株は、培養細胞で複製し、ウイルス産生が観察できる HCV 株である。そのプロテアーゼ領域を J6CF 株由来のものに置換すると、ゲノム複製には影響がなく、ウイルス産生だけができなくな

ることから、HCV プロテアーゼはゲノム複製だけでなく、ウイルス粒子形成時にも関わっていた。ウイルス粒子形成に重要な領域は NS3 プロテアーゼ領域の C 末端側に存在した。

[村山麻子, 脇田隆字, 加藤孝宣]

#### (4) 新規 HuH-7 細胞株を用いた効率の良い HCV 培養系の作製

ウイルスの感染予防ワクチンの開発には効率の良いウイルス大量培養系が不可欠であるため、新たな細胞株を用いたより効率の良い HCV 培養増殖系の構築を試みた。HuH-7 細胞からクローニングした細胞株を利用すると従来使われている Huh7.5.1 細胞と比較して約 10 倍のウイルスが得られた。詳細な検討の結果、細胞内での感染性ウイルス粒子形成の効率が良く、また FACS 解析により、感染の広がるスピードが早いことが明らかとなった。

[村山麻子, 菅野美津子 (東芝 RDC), 吉村斉湖 (東芝 RDC), 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

#### (5) NS5A と相互作用するヒトプロテインキナーゼの探索

NS5A のリン酸化はウイルスゲノム複製だけでなく、感染性ウイルス粒子の形成にも重要である。そこで、NS5A と相互作用するヒトプロテインキナーゼを網羅的手法により探索した。その結果、404 種類のヒトプロテインキナーゼのうち、89 種類 (うち 79 種類がセリン/スレオニンプロテインキナーゼ) において NS5A との強固な相互作用が認められた。

[政木隆博, 澤崎達也 (愛媛大), 遠藤弥重太 (愛媛大), 鈴木哲朗 (浜松医大), 加藤孝宣, 脇田隆字]

#### (6) NS5A のリン酸化に関与する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの探索

NS5A と強く相互作用するヒトプロテインキナーゼを、それぞれ  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  存在化で精製 NS5A と混和し、SDS-PAGE 後オートラジオグラフィーにより NS5A のリン酸化を解析した。その結果、9 種類のセリン/スレオ

ニンプロテインキナーゼが NS5A をリン酸化する活性を有していた。うち 1 種類は NS5A のリン酸化に関与することが既に報告されているカゼインキナーゼ 2 であった。

[政木隆博, 澤崎達也 (愛媛大), 遠藤弥重太 (愛媛大), 鈴木哲朗 (浜松医大), 加藤孝宣, 脇田隆字]

#### (7) HCV の生活環に関与するセリン/スレオニンプロテインキナーゼの同定

AlphaScreen 解析, *in vitro* リン酸化アッセイによりスクリーニングされた 9 種類のプロテインキナーゼについて、それらの細胞内発現を siRNA を用いてノックダウンすることにより、感染性 HCV 産生を制御する 2 種類の新規プロテインキナーゼを見出した。

[政木隆博, 鈴木哲朗 (浜松医大), 加藤孝宣, 脇田隆字]

#### (8) HCV の生活環に関与する NS5A 結合プロテインキナーゼの同定

AlphaScreen 解析により NS5A と特異的に結合するプロテインキナーゼを 7 種類同定した。この中から、siRNA を用いたノックダウン実験により、HCV 生活環の制御に関与する新規プロテインキナーゼを 3 種類同定した (2 種類は HCV ゲノム複製に、1 種類は HCV 粒子形成に関与)。

[政木隆博, 加藤孝宣, 脇田隆字]

#### (9) NS5A との相互作用により活性調節を受ける新規プロテインキナーゼの探索

HCV 蛋白質がプロテインキナーゼと相互作用することでキナーゼ活性を調節し、ウイルス性肝炎の病態形成に関与することが知られている。今回、AlphaScreen 解析において NS5A との相互作用が強固であったプロテインキナーゼを対象に、NS5A との相互作用により活性調節を受ける新規キナーゼの探索を試みた。キナーゼ基質のリン酸化をリン酸化抗体を用いて解析し、NS5A 発現細胞において負に活性調節を受けるプロテインキナーゼを同定した。

[政木隆博, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(10) HCV ゲノム複製を制御する NS5A 結合ペプチドの取得

大腸菌発現システムを利用し, JFH-1 株 NS5A 蛋白質の domain I 領域を発現させ, 精製した. この精製 NS5A 蛋白質を用いて 11 種類の NS5A 結合ペプチドを取得した. 次に, 取得ペプチドを HCV サブゲノミックレプリコン細胞に導入し, 各 NS5A 結合ペプチドの抗 HCV 作用を解析したところ, 11 種類の NS5A 蛋白質結合ペプチドのうち, 9 種類において HCV ゲノム複製の有意な抑制効果を認めた.

[政木隆博, 菅 裕明 (東大先端研), 鈴木哲朗 (浜松医大), 加藤孝宣, 脇田隆字]

(11) JFH-1 core と種々の株の NS5A との相互作用の解析

Core と NS5A の相互作用は HCV 感染性粒子産生の初期段階に重要である事が知られている. JFH-1 株及び, 野生型では培養細胞内で増殖しない H77, Con1, J6CF, MA 株の NS5A と JFH-1 の core を 293T 細胞に強制発現させ, core による免疫沈降法により相互作用を比較した. その結果, H77, Con1, MA 株の NS5A において core との相互作用の増強を認めた. 一方 J6 株では JFH-1 株と同等であった.

[岡本有加, 政木隆博, 村山麻子, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(12) JFH-1 株における NS5A の置換がウイルス増殖に与える影響

JFH-1 株の NS5A 全体を 1a 型 H77c 株, 1b 型 Con1 株, 2a 型 J6CF 株, 2b 型 MA 株にそれぞれ置き換えた全長キメラ株を作製し, これらの増殖を検討した. H77c 株に置き換えたキメラ株では複製能及び粒子産生ともに変化せず, Con1 株に置き換えたキメラ株では, 複製, 感染性粒子産生に低下が見られた. 一方, J6 及び MA 株に置き換えたキメラ株では, 複製能に変化は無く感染性粒子産生のみ上昇した.

[岡本有加, 政木隆博, 村山麻子, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(13) JFH-1 株における NS5A の C 末端領域の置換がウイルス増殖に与える影響

J6CF 株及び MA 株は野生型では培養細胞内で増殖出来ないが, JFH-1 株の NS5A をこれらの株に置換すると感染性粒子産生能が上昇する. この原因として NS5A-5B 間の切断効率の変化が考えられた. これを確認するため, JFH-1 株の NS5A の C 末 10 アミノ酸を J6 型, 或は MA 型にした変異体を作製し, 増殖能を検討した結果, この領域の置換のみで感染性粒子産生の上昇を認めた.

[岡本有加, 政木隆博, 村山麻子, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(14) HCV JFH-1 キメラ株を用いた NS5A 阻害剤の株特異的抗ウイルス活性の評価

HCV JFH-1 株の NS5A 領域を H77 株 (1a 型), Con1 株 (1b 型), J6CF 株 (2a 型), MA 株 (2b 型) の NS5A に入れ換えたキメラ株を作製し, NS5A 阻害剤 (BMS-790052) に対する感受性を評価した. NS5A 阻害剤の投与によりすべてのキメラ株で用量依存的に複製阻害を認めた. しかし, その阻害活性は株により異なり, 遺伝子型 1 のキメラ株では高い感受性を示したが, 遺伝子型 2 のキメラ株では抵抗性であった.

[岡本有加, 政木隆博, 村山麻子, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(15) Poly I:C による肝細胞での各種 IFN と ISGs の誘導能の検討

HuH-7 細胞をクローニングし, 内因性インターフェロン (IFN) シグナル関連分子である RIG-I および MDA5 の発現が良い細胞株 HuH-7T5 と 7T10 を得た. HuH-7T5 細胞と 7T10 細胞に Poly I:C をリポフェクションし, 誘導された IFN シグナルを測定した. その結果, 強い III 型 IFN シグナルの誘導を認めたが, I 型 IFN シグナル誘導はごく軽度だった. また, ISGs の誘導は III

型 IFN と同様に十分量認められた。これらの細胞の III 型 IFN, ISGs の誘導を Huh7.5.1 細胞と比較すると, Huh-7T5 と 7T10 細胞の方が約 10 倍高値であった。

[藤田めぐみ, 菅野美津子 (東芝 RDC), 吉村斉湖 (東芝 RDC), 杉山奈央, 村山麻子, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(16) HCV 感染細胞における ISGs と各種 IFN の誘導能の検討

III 型 IFN の強い誘導を認める Huh-7T5 細胞に HCV JFH-1 の適応変異株を感染させ, Poly I:C のリポフェクションによる IFN シグナルの誘導に与える影響を検討した。その結果, III 型 IFN, ISGs の誘導はいずれも感染細胞で約 1/10 に低下しており, HCV JFH-1 株の感染により IFN シグナルおよび ISGs の誘導が抑制されていると考えられた。

[藤田めぐみ, 菅野美津子 (東芝 RDC), 吉村斉湖 (東芝 RDC), 杉山奈央, 村山麻子, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(17) HCV 全長 RNA の導入による ISGs と各種 IFN の誘導能の検討

HCV の肝細胞への感染による IFN 誘導の評価のため, Huh-7T5 細胞に JFH-1 株全長の RNA を導入し, IFN および ISGs の mRNA を測定した。その結果, 導入後 12 時間までは poly I:C と同程度の誘導が認められ, HCV RNA の導入でも poly I:C と同様に IFN が誘導されていると考えられた。また, HCV RNA 導入 12 時間以降は JFH-1 株全長 RNA 導入細胞の方が poly I:C 導入細胞と比べ, III 型 IFN, ISGs の誘導が低値となり, HCV の増殖複製によりこの誘導が阻害されていると考えられた。

[藤田めぐみ, 菅野美津子 (東芝 RDC), 吉村斉湖 (東芝 RDC), 杉山奈央, 村山麻子, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(18) HCV JFH-1 株の感染による各種 IFN と ISGs 誘導能の検討

HCV RNA 導入による IFN 誘導は観察されたため, 次に肝細胞への HCV 感染による IFN の誘導について検討を行った。感染力価の高い HCV JFH-1 適応変異株を

Huh7.5.1 細胞と Huh-7T5 細胞に感染させ, IFN および ISGs の誘導を評価した。しかし, 全長 HCV RNA の導入で観察されたような誘導は認めなかった。そこで, HCV JFH-1 株の培養上清を濃縮精製後, 抽出した RNA の導入により IFN と ISGs の誘導を評価したが, 誘導は認めなかった。

[藤田めぐみ, 菅野美津子 (東芝 RDC), 吉村斉湖 (東芝 RDC), 杉山奈央, 村山麻子, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(19) ビタミン D およびその代謝産物が HCV の複製増殖に与える影響の解析

最近, 慢性 C 型肝炎の IFN 治療においてビタミン D (VD) を併用することで治療効果が向上することが報告されている。しかし, VD 投与の抗 HCV 作用については明らかではない。そこで, VD とその代謝産物の抗 HCV 作用について培養細胞での感染増殖系を用い検討を行った。その結果, VD には抗 HCV 作用は認めず, その代謝産物である 25(OH)VD に抗 HCV 作用があることが明らかになった。

[松村卓哉 (昭和大), 井廻道夫 (昭和大), 杉山奈央, 村山麻子, 政木隆博, 藤田めぐみ, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(20) ビタミン D 代謝産物である 25(OH)VD の抗 HCV 作用の解析

ビタミン D (VD) の肝臓での代謝産物である 25(OH)VD に抗 HCV 作用が有ることがわかった。そこで, その作用機序について培養細胞にて解析を行った。その結果, この 25(OH)VD は HCV の感染や細胞内での複製には影響を与えず, 細胞内での感染性ウイルス粒子形成を阻害していることが明らかになった。今後, 25(OH)VD は新しい抗 HCV 薬として使用できる可能性が示された。[松村卓哉 (昭和大), 井廻道夫 (昭和大), 杉山奈央, 村山麻子, 政木隆博, 藤田めぐみ, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(21) ビタミン D 代謝産物である 25(OH)VD に対する耐性変異株の誘導

ビタミン D (VD) の肝臓での代謝産物である 25(OH)VD に抗 HCV 作用が有ることがわかった。そこで、その 25(OH)VD に対する耐性変異株を誘導するため、HuH-7 細胞に HCV JFH-1 株を導入し、25(OH)VD を 1 $\mu$ M で処理し長期培養を行った。その結果、培養 25 日目頃より培養上清の HCV コア抗原量の増加を認め、耐性変異株が誘導されていると考えられた。増殖している HCV 株を全 ORF をシーケンスしたところ、NS3 のヘリカーゼ領域に一カ所の非同義置換を同定した。

[松村卓哉 (昭和大), 井廻道夫 (昭和大), 杉山奈央, 村山麻子, 政木隆博, 藤田めぐみ, 脇田隆宇, 加藤孝宣]

(22) HCV 生体内適応変異株の抗アポトーシス活性の検討

HCV 感染の慢性化機序の解明のため、HCV JFH-1 株のチンパンジー感染実験で同定された生体内適応変異株が宿主細胞のアポトーシスに与える影響を検討した。その結果、生体内適応変異株の感染細胞では通常の JFH-1 株に比べ、TNF- $\alpha$  や FAS ligand などのサイトカイン投与によるアポトーシス誘導が強く抑制されていた。適応変異株のキメラウイルスを用いた検討から、この抑制効果には、構造領域・非構造領域両方の変異が関与していると考えられた。

[Mohsan Saeed, 椎名正明 (東北大学), 杉山奈央, 脇田隆宇, 加藤孝宣]

(23) JFH-1 株培養細胞適応変異株の性状解析

JFH-1 株を培養細胞に導入し長期培養を行うことにより得られた適応変異株の性状について解析を行った。HCV JFH-1 株を 25 日間培養することにより通常の JFH-1 株よりも増殖複製能の高い適応変異株を得た。全 ORF のダイレクトシーケンスの結果、E2・NS3・NS5B にそれぞれ一つずつ変異を同定した。これら同定された変異を詳細に検討した結果、これらの変異は細胞内での効率的な感染性ウイルス粒子形成能および精製されたウイルス粒子の感染性に影響を与えていることが明らかとなった。

[杉山奈央, 加藤孝宣, 脇田隆宇]

(24) HCV RNA 測定法とコア抗原測定法の相関についての検討

HCV のウイルス量測定法評価のため、日本赤十字社より HCV 陽性検体の供与を受けパネル検体を作製した。このパネル検体を用い、HCV RNA およびコア抗原定量法によりウイルス量を測定し、測定値の分布と相関について検討した。その結果、HCV コア抗原定量法の中でその測定値が HCV RNA 定量の結果と乖離する例が数検体認められた。これらの検体のコア領域の塩基配列を比較検討した結果、コア抗原量の測定値に影響を与える領域として、コア領域の aa 47 - 49 のアミノ酸変異が同定された。この領域に 2 つのアミノ酸変異を認めた検体では、HCV RNA 量との相関から推定されるコア抗原量の期待値の 1/10 程度の値を示した。

[杉山奈央, 村山麻子, 政木隆博, 渡士幸一, 鈴木亮介, 相崎英樹, 鈴木哲朗 (浜松医大), 脇田隆宇, 加藤孝宣]

(25) JFH-1/Con1 キメラレプリコンのコロニー形成法による解析

JFH-1 株のサブジェノミックレプリコンを基としてそれぞれの非構造蛋白質領域遺伝子を Con1 株に交換して代償できるかどうかを試みた。コロニー形成を行った結果、NS3 と NS5B の領域を Con1 に交換するとコロニーが全く形成されなかった。一方、NS4A, NS4B, NS5A を Con1 に交換すると wild type と同程度にコロニーが形成された。また、NS4A~NS5A を交換した場合も wild type と同程度にコロニーが形成された。

[金ソレイ, 伊達朋子, 加賀美奈子, 相崎英樹, 脇田隆宇]

(26) JFH-1/Con1 キメラレプリコンの複製活性の測定

ルンフェラーゼによるサブジェノミックレプリコンで複製活性を測定した。Genotype 2a 株の JFH-1 株を基にして非構造蛋白質領域遺伝子を genotype 1b の Con1 株に交換した。その結果、NS3, NS5B を交換した

ものは全く複製活性がなかったが、NS4A, NS4B, NS5A を交換した場合は複製活性が見られた。さらに NS4A, NS4B, NS5A をまとめて交換すると単独で交換した場合より高い複製活性がみられた。

[金ソレイ, 伊達朋子, 加賀美奈子, 相崎英樹, 脇田隆字]

(27) 全長の JFH-1/Con1 キメラウイルスの細胞内複製とウイルス産生の評価

HCV ゲノムの非構造蛋白質領域遺伝子を Con1 株に交換し, Huh7.5.1 細胞にトランスフェクションして, 細胞内と上清中の HCV core を測定した。その結果, NS4A, NS4B, NS5A を Con1 に交換しても細胞内複製活性があり, ウイルス粒子産生も可能だった。また, NS4A-NS4B を交換すると単独で交換するより高い複製活性やウイルス産生を示した。

[金ソレイ, 伊達朋子, 加賀美奈子, 相崎英樹, 脇田隆字]

(28) NS3 プロテアーゼ領域を Con1 に入れ替えたレプリコンの適応変異の同定

ネオマイシン耐性遺伝子を持つ JFH-1 株のサブジェノミックレプリコンの NS3 プロテアーゼ領域遺伝子を Con1 株に交換した。その合成 RNA を HuH7 細胞にトランスフェクションし, ネオマイシンによる選択培養を行った。形成されたコロニーを解析して, レプリコンゲノムに導入された適応変異を決定した。この適応変異をサブジェノミックレプリコンに挿入すると, コロニー形成能が上昇した。

[金ソレイ, 伊達朋子, 加賀美奈子, 相崎英樹, 脇田隆字]

(29) 遺伝子型 3a の患者血清から分離した HCV 株の解析

フランスの肝炎患者の血清中の HCV ゲノムの遺伝子配列を解析し, その HCV 株のコンセンサス配列を決定した。その塩基配列を解析した結果, この HCV 株は遺伝子型 3a に属することが分かった。

[ススムエー, Saeed Mohsan, 相崎英樹, 脇田隆字]

(30) HCV 遺伝子型 2a/1b のキメラウイルスを用いた NS5B ポリメラーゼ阻害剤の抗 HCV 作用の検討

遺伝子型 2a の JFH-1 株の NS5B 領域を遺伝子型 1b の配列に置換したキメラウイルスを作製し, NS5B ポリメラーゼ (RdRp) 阻害剤の薬剤評価を行った。RdRp の活性部位に作用する PSI-6130 を添加した細胞では JFH-1 とキメラウイルス場合いずれも感受性がみられたが, RdRp パーム部位に作用する JTK-109 を添加した細胞ではキメラウイルスでは抗 HCV 作用がみられたが, JFH-1 ウイルスでは非感受性であった。以上のことから, このキメラウイルスを用いることで日本人に多い遺伝子型 1b に対する RdRp 阻害剤の薬剤評価が可能になった。

[ススムエー, 伊達朋子, 朝長充則 (日本たばこ産業), 相崎英樹, 脇田隆字]

(31) 抗コアイントラボディによる HCV 増殖抑制のメカニズムの解析

HCV コア蛋白質に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから, 抗体の可変部の遺伝子をクローニングし, シングルドメインまたは scFv を発現するプラスミドを作製した。抗体分子とコア蛋白質との相互作用を免疫沈降法によって確認した。また HCV 感染細胞に抗体分子を発現させると, 培養上清中の HCV 感染価が減少する事を確認した。現在, イントラボディによる HCV 産生を抑制させるメカニズムの解明を進めている。

[斎藤憲司, 鈴木亮介, 松田麻未, 鈴木哲朗 (浜松医大), 相崎英樹, 脇田隆字]

(32) HCV トランスパッケージング型粒子の産生を向上させる変異の同定とその解析

これまでにトランスパッケージング型 HCV 粒子 (HCVtcp) の産生系を確立した。構造蛋白質発現組換えアデノウイルスを感染させたパッケージング細胞を用い, HCVtcp の blind-passage を行う事により, NS3

領域に変異を有する増殖の良いトランスパッケージング型粒子が得られた。この NS3 の変異は、複数の遺伝子型や株由来の構造蛋白質を用いた場合にも、ウイルスの粒子形成効率を向上させた。

[鈴木亮介, 石井孝司, 鈴木哲朗 (浜松医大), 齋藤泉 (東大), 鐘ヶ江裕美 (東大), 相崎英樹, 脇田隆字]

(33) HCV の粒子形成に重要な HCV NS2 結合宿主因子の同定

分割ユビキチン法を利用した酵母 two hybrid システムにより, HCV NS2 と結合する宿主因子をヒト肝臓ライブラリーよりスクリーニングし, さらに siRNA を用いてその発現をノックダウンさせ, ウイルスの産生に影響する宿主因子を選別した。その結果, HCV の粒子形成に重要な役割を果たしていると考えられる膜蛋白質の同定に成功した。

[鈴木亮介, 鈴木哲朗 (浜松医大), 相崎英樹, 脇田隆字]

(34) HCV のライフサイクルにおける E1, E2 糖鎖の役割

E1, E2 の糖鎖の機能を解析するため, 糖鎖修飾部位アミノ酸に NQ 変異 (アスパラギンをグルタミンに置換) を導入し NQ 変異型 HCVcc の産生量およびその感染性を調べた。粒子産生については 4 ヶ所の変異 (E1NQ1, E1NQ2, E2NQ8, E2NQ10) で著しく低下した。感染性については 7 ヶ所の変異 (E1NQ1, E1NQ2, E2NQ3, E2NQ4, E2NQ7, E2NQ8, E2NQ10) で低下した。この結果から糖鎖は細胞侵入だけではなく粒子構造の形成にも重要な機能を担うと言える。

[渡邊則幸, 伊達朋子, 相崎英樹, 脇田隆字]

(35) HCV E2 タンパク質の結晶化

ハエ細胞で E2 タンパク質 E2dTM の作製を試みた。精製した E2dTM は単量体の割合が非常に高く, HCVpp の侵入や HCVcc の感染について阻害活性を示すことがわかった。E2dTM をゲルろ過にて分画し単量体の E2dTM を得た。単量体 E2dTM についても感染阻害活性は有し

ていた。また, 糖鎖解析の情報から, HCV の生活環に影響しない糖鎖修飾アミノ酸の NQ 変異型 E2dTM-NQ569 についても発現, 精製を行い単量体の E2dTMNQ569 を得た。現在, E2dTM と E2dTM-NQ569 の 2 種の精製タンパク質について結晶解析を行っている。

[渡邊則幸, 伊達朋子, 相崎英樹, 脇田隆字]

(36) E2 タンパク質の中和抗体誘導について

293 細胞とハエ S2 細胞で作成した E2 タンパク質はそれぞれ, 前者はタンパク質自体では HCVcc に対して感染阻害効果を示さないが後者は阻害効果を示した。つまり, それぞれの E2 タンパク質で立体構造が異なると考えられる。そこで, これらの E2 タンパク質をマウスに免疫して中和抗体の誘導を比較した。その結果, 293 細胞由来 E2 タンパク質では中和抗体を誘導したが, ハエ S2 細胞由来 E2 タンパク質では誘導されなかった。293 細胞由来 E2 タンパク質は立体構造が正常ではないため中和可能なエピトープが露出していると予想できる。

[渡邊則幸, 伊達朋子, 相崎英樹, 脇田隆字]

(37) HCV E2 タンパク質と結合する特殊ペプチドの解析

感染阻害活性を有する単量体 E2dTM を用いて E2 に結合する特殊ペプチドの探索を行った。特殊ペプチドはペプチド分子内のシステイン残基で結合を作り環状の構造を示すことから安定性に優れたペプチドである。また, 多様性の高い特殊ペプチドライブラリーを用いることで高親和性の特殊ペプチドを同定できる。スクリーニングから得られた結合能の高い特殊ペプチドの 4 個について粗精製を行い, その機能について解析を行った。ウイルス感染への影響を解析したところ, 2 個については HCVcc 感染について阻害活性を示した。

[渡邊則幸, 脇田隆字]

(38) HCV-NS5A 蛋白に結合し HCV 産生に関与する宿主因子の同定

NS5A 発現細胞から pull-down 法により NS5A に結合

する膜蛋白を精製し、プロテオーム解析を施行したところ、未報告蛋白 20 種を含む約 25 種のヒト蛋白が同定された。これらについて HCV レプリコン細胞および HCV 感染細胞を用いて siRNA screening を行ったところ、そのうち 6 種が HCV 産生に関わっており、特に翻訳、複製過程に関与していることが示唆された。

[後藤耕司, 山越 智 (生物活性物質部), 小池和彦 (東大消化器内科), 鈴木哲朗 (浜松医大), 相崎英樹, 脇田隆字]

#### (39) HCV 粒子形成に関与する脂肪滴周辺膜蛋白の同定と機能解析

脂肪滴周辺膜のプロテオーム解析を行い、45 種類の蛋白を同定し、siRNA によるスクリーニングで、HCV 粒子形成に関与する生体膜蛋白として HSD11 を見出した。現在、HSD11 の肝細胞における生理的な役割について解析を進めている。

[相崎英樹, 深澤征義 (細胞化学部), 花田賢太郎 (細胞化学部), 本島清人 (明治薬科大学), 鈴木哲朗 (浜松医大), 脇田隆字]

#### (40) HCV 感染が宿主細胞の脂質代謝に与える影響

HCV 感染による肝脂肪化の原因のひとつとして、超低比重リポ蛋白 (VLDL) 分泌低下が報告されている。一方、VLDL は HCV の感染性に必須と報告されており、これらの矛盾点を解明するため HCV 感染に伴う肝細胞の脂肪化の分子メカニズムについて、生体での脂質輸送の中心を担っているリポ蛋白に注目し解析した。HCV 感染後、培養上清中の VLDL が増加し、低比重リポ蛋白 (LDL) が低下することを見出し、その原因として HCV 感染細胞での VLDL 分解酵素である Hepatic lipase の発現低下を見出した。

[相崎英樹, 鈴木哲朗 (浜松医大), 脇田隆字]

#### (41) HCV 感染細胞のメタボローム解析

HCV 感染に伴う細胞内代謝の変化を理解するため、代謝物質の網羅的解析 (メタボロミクス) を行った。HCV 感染により、TCA 回路, プリン・ピリミジン合成系な

ど蛋白核酸合成等は低下し, ATP, GTP, phosphocreatine 等のエネルギー供与体は減少し, 一方解糖系は著名に亢進していた。蛋白核酸合成の低下はウイルス感染に伴う「シャットオフ」現象の可能性があり, ウイルス増殖にエネルギーが消費され, 解糖系を亢進させてエネルギー産生を行うというウイルス感染の急性期状態を示している可能性が考えられた。今後, 代謝酵素群の mRNA, 蛋白レベルの変化, 関与する HCV 因子の同定, メカニズムの解明等を目指す。

[松田麻未, 相崎英樹, 鈴木哲朗 (浜松医大), 脇田隆字]

#### (42) 蛍光標識 HCV 粒子による感染過程の可視化の検討

HCV 感染初期過程を可視化するために, 蛍光標識コレステロール NBD-6 を HCV 粒子表面膜に取り込ませた後, ショ糖密度勾配遠心操作で精製し, 蛍光標識 HCV 粒子を調製し, 氷上でのウイルス吸着処理後, 顕微鏡観察したところ, クラスタ状の蛍光シグナルが認められた。HCV 粒子が細胞表面上に広く均一に吸着するのではなく, なんらかのドメインを足場に局所的に吸着することが示唆された。本蛍光標識 HCV 粒子は HCV の細胞への感染過程の解析に有用であることが示唆された。

[山本真民, 相崎英樹, 鈴木哲朗 (浜松医大), 脇田隆字]

#### (43) リポ蛋白と HCV 粒子の相互作用に粒子表面のコレステロールが及ぼす影響の解析

HCV の感染にはリポ蛋白が重要であると報告されている。そこで, HCV 粒子を抗アポリポ蛋白抗体により免疫沈降することでそれらの相互作用を解析した。その結果, VLDL の構成成分である ApoE と HCV 粒子の相互作用に HCV 粒子表面コレステロールが密接に関与することが示唆された。

[山本真民, 相崎英樹, 鈴木哲朗 (浜松医大), 脇田隆字]

(44) Radial-flow bioreactor(RFB)を用いた、三次元高密度培養法による HCV 感染機構の解析

RFB はヒト肝癌細胞株を三次元高密度培養できる装置である。このシステムを用いてヒト肝癌由来細胞株

(FLC-4) に HCV-2a 株 (JFH-1 株) の感染実験を行ったところ、培養上清中の HCV-RNA 量は感染後 5 日目に最大  $10^6$  copies/ml に達し、以後 7 週間以上にわたり持続的に検出できた。平皿培養では感染が成立しなかった事より、細胞を三次元培養する事で感染・増殖が成立したと考えられ、現在解析を進めている。

[松本喜弘, 相崎英樹, 松浦知和 (慈恵医大), 脇田隆字]

(45) グリチルリチンの C 型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス作用の解析

グリチルリチンは慢性 C 型肝炎患者に用いられているが、その抗 HCV 作用については不明である。そこでグリチルリチンの抗 HCV 作用について検討した。その結果、HCV 生活環の複数ステップにおいて効果が認められ、特に感染性粒子形成において強い阻害効果を示した。今後、グリチルリチンの抗 HCV 作用の分子メカニズムの解析を行う。

[松本喜弘, 相崎英樹, 松浦知和 (慈恵医大), 和気健二郎 (ミノファージェン製薬), 脇田隆字]

(46) 感染性 HCV 産生を変化させる低分子化合物の同定

感染性 HCV 粒子産生系を用いて、感染性 HCV 産生を変化させる低分子化合物のスクリーニングをおこなった。さらに得られたヒット化合物が HCV 生活環のどのステップに関わるかを解析した結果、1) 翻訳/ゲノム複製、2) 会合、3) 会合以降放出まで、に影響するものに分類された。

[渡士幸一, 内田奈々子, 脇田隆字]

(47) miRNA 阻害剤を用いた HCV 複製制御の解析

これまでに同定した miRNA 阻害剤は、Huh-7 細胞において AG02 と miR-122 の結合を解離させることが示

された。HCV ゲノム複製を抑制しない誘導体にはこの解離作用が認められなかったことより、この miRNA 阻害剤は AG02 と miR-122 の関連を解除することにより HCV ゲノム複製を抑制することが示唆された。

[渡士幸一, 下遠野邦忠 (千葉工業大), Kuan-Teh Jeang (National Institutes of Health, USA), 脇田隆字]

(48) halopemide による感染性 HCV 産生抑制機構の解析

化合物スクリーニングにより、感染性 HCV 産生を低下させるものとして halopemide を同定した。この化合物は細胞毒性を引き起こさない濃度において感染性 HCV 産生を約 1/20 以下に減少させた。またこのとき HCV シュードタイプウイルスやレプリコンシステムの活性にはほとんど影響を与えないことより、会合から放出に至る HCV 生活環後期過程を阻害する可能性が考えられた。

[内田奈々子, 渡士幸一, 脇田隆字]

(49) 肝繊維化における肝星細胞の役割の解析

肝星細胞の活性化が肝線維化と密接に関連していることから、HCV が肝星細胞で複製増殖するかを明らかにすることは重要な課題である。HCV サブゲノム RNA を不死化ヒト肝星細胞に導入し、薬剤 (G418) 存在化で培養することで、HCV ゲノムが恒常的に複製する細胞株の樹立に成功し、ウイルス複製に伴う細胞外マトリックス関連遺伝子の発現変化について解析した。JFH-1 株はヒト肝星細胞株へのレセプター依存的な感染は認められなかったが、細胞間伝搬様式で肝癌細胞から星細胞へ移行する可能性が示された。

[渡邊則幸, 相崎英樹, 鈴木哲朗 (浜松医大), 脇田隆字]

(50) HCV 複製複合体における ATP 消費量の検証

HCV レプリコン細胞 (genotype 1b, 2a) と肝癌由来細胞株 Huh7 細胞を digitonin で処理し、複製が維持された条件下で複製複合体を含む膜画分を分離した。ATP を添加しその消費量を比較したところ、Huh7 細胞

と比較して、HCV レプリコン細胞の膜画分における ATP の消費量が有為に亢進していた。インターフェロンを処理し複製を阻害したところ、ATP の消費量は低下した。以上の結果から、HCV の複製は多量の ATP を消費していることが示された。

[安東友美, 今村博臣(阪大), 鈴木亮介, 相崎英樹, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

#### (5 1) HCV 複製細胞における ATP 局在の解析

FRET 技術を利用し生細胞内の ATP レベルを可視化するプローブ(ATeam)を用い、HCV 複製細胞における ATP ダイナミクスを解析した。ATP 濃度と FRET レベルの相関を測定し濃度を算出したところ、細胞質の ATP 濃度は 2 mM から 1 mM に低下していた。一方、複製複合体と考えられる顆粒状の発現部位では、5 ~ 10 mM と大幅に ATP 濃度が亢進していた。HCV 複製細胞では効率的な複製維持のために、細胞質から複製複合体に ATP が流入していると考えられる。

[安東友美, 今村博臣(阪大), 鈴木亮介, 相崎英樹, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

#### (5 2) HCV ゲノムの多様性の解析

HCV 陽性血清から RNA を抽出し Illumina 社 GAIIX で解析した。既知の HCV ゲノム配列を参照配列としたマッピングと、de novo アセンブル、blast を利用した近縁配列比較を利用し、最も存在比の高い allele の組み合わせであるコンセンサス配列を決定した。続いてコンセンサス配列を参照配列としたマッピングを行い、約 9.6 kb のゲノム上に変異が混在する箇所を 200 数カ所同定した。HCV のウイルスゲノム RNA が確かに多様性を持つことが示された。

[安東友美, 相崎英樹, 関塚剛史(病原体ゲノム解析研究センター), 黒田 誠 (病原体ゲノム解析研究センター), 脇田隆字]

#### (5 3) 個々の HCV ゲノム全長配列決定手法の開発

GAIIX 解読結果から変異を含まないプライマーを設計し、多様性を維持したライブラリーを作製した。

454 社 GS FLX で解析し、長いリード長を利用して変異の組み合わせを推定した。続いて変異を含むプライマーを設計し PCR で増幅した後、direct sequence を行い変異の組み合わせを全長にわたり確定した。患者血清中に少なくとも 3 種類の独立したウイルスゲノム RNA 配列が存在することが示された。

[安東友美, 相崎英樹, 杉山真也 (国立国際医療センター), 溝上雅史 (国立国際医療センター), 関塚剛史 (病原体ゲノム解析研究センター), 黒田 誠 (病原体ゲノム解析研究センター), 脇田隆字]

#### (5 4) 高純度 HCV 粒子精製方法の構築

細胞培養によって得られた遺伝子組換え C 型肝炎ウイルス粒子 (HCVcc) を使用して C 型肝炎ワクチンを開発する上で、細胞培養上清からの高効率な精製方法の構築は重要である。そこで、簡便にスケールアップが可能である限外濾過およびクロマトグラフィー法を用いた HCV 粒子の精製方法を選択し、その精製効率を検討した。

[横川 寛, 森山正樹, 赤澤大輔 (東レ医薬研), 中村紀子 (東レ医薬研), 望月英典 (東レ医薬研), 石井孝司, 加藤孝宣, 脇田隆字]

#### (5 5) HCV 粒子ワクチンの抗 HCV エンベロープ抗体誘導能の評価

Huh-7 細胞で作製した J6/JFH-1 キメラ HCV 粒子を限外濾過およびシヨ糖密度勾配超遠心法で精製した。UV で不活化した HCV 粒子を、BALB/c マウスに MPL+TDM をアジュバントとして腹腔内投与し、血清を採取して、様々なアイソタイプ抗体の誘導を調べた。

[森山正樹, 横川 寛, 赤澤大輔(東レ医薬研), 中村紀子 (東レ医薬研), 望月英典 (東レ医薬研), 石井孝司, 加藤孝宣, 脇田隆字]

#### (5 6) HCV 粒子ワクチンに最適なアジュバントの検討

Huh-7 細胞で作製した J6/JFH-1 キメラ HCV 粒子を限外濾過およびシヨ糖密度勾配超遠心法で精製した。UV

で不活化した HCV 粒子をアジュバントとともに BALB/c マウスに腹腔内投与した。採取した血清を用いて、抗体価および in vitro 中和活性に対する様々なアジュバントの効果を調べた。

[森山正樹, 横川 寛, 赤澤大輔 (東レ医薬研), 中村紀子 (東レ医薬研), 望月英典 (東レ医薬研), 石井孝司, 加藤孝宣, 脇田隆字]

#### (57) 肝炎情報の収集とデータベース構築及び情報発信

肝炎ウイルス感染の予防, 肝炎ウイルスキャリア対策, 肝癌死亡の減少に貢献することを目的として, 肝炎ウイルス感染, 病態等を含む国内外の情報等の収集とデータベースの構築, および情報の提供を行って来た。C 型急性肝炎に関する疫学情報は少ない。そこで, 感染症法による届出基準に基づき 1999 年 4 月から 2009 年 12 月までの間に提出された本邦における C 型急性肝炎の年別発生状況, 年齢別分布, 都道府県別報告状況, 症状, 感染原因・経路等について解析した。急性肝炎の発生動向を全数把握できる制度は他国でも少なく, これらの情報は予防対策, 啓発活動に大変有効であると考えられた。

[相崎英樹, 田中純子 (広島大), 脇田隆字]

#### 4. E 型肝炎ウイルス (HEV) に関する研究

##### (1) HEV の感染性を規定する宿主側因子の探索

PLC/PRF/5 の single cell cloning を行い, HEV の感染増殖が可能な細胞株と不可能な細胞株をそれぞれ複数取得した。感染できない細胞株も, 感染性の HEV RNA をトランスフェクションすると HEV 抗原が分泌されることから, 細胞内でのウイルス増殖能には問題がないことが示唆された。感染性を規定する宿主側の因子について, プロテオーム解析やアレイ解析の手法で探索を行っている。

[石井孝司, 吉崎佐矢香, 李 天成, 武田直和 (阪大微研, 日本・タイ感染症共同研究センター), 脇田隆字]

##### (2) HEV の構造蛋白中の感染性を規定する残基の解析

HEV の構造蛋白 (ORF2) に変異を導入し, ウイルスの増殖性への影響を調べた。その結果, 178 番目のグルタミン酸をアスパラギン酸に変異させた場合に増殖性を失うことが判明した。本変異を持つ ORF2 を発現する組換えバキュロウイルスを作成したところ, 蛋白は発現するが粒子は形成されなかった。立体構造モデルに当てはめたところ, 本残基は ORF2 が 2 量体を形成する際に 2 つの蛋白が相互作用する位置にあり, 変異することで 2 量体が形成できなくなっていることが判明した。

[石井孝司, 森 嘉生 (ウイルス第 3 部), 吉崎佐矢香, 李 天成, 武田直和 (阪大微研, 日本・タイ感染症共同研究センター), 脇田隆字]

##### (3) HEV の構造蛋白 C 端領域の粒子形成に及ぼす役割

ORF2 の C 端 52 アミノ酸は, 組換えバキュロウイルスを用いた解析では粒子形成には必須でないことが判明している。本領域を deletion により欠損させた全長クローンから合成された RNA には全く増殖性がなかったが, stop codon の導入により欠損させた全長クロンの RNA を細胞に導入した場合, ORF2 の分泌は観察されたが感染性を示さなかった。感染性がない原因を明らかにするため, 粒子形成の有無およびウイルス RNA の粒子中への取り込みについて検討している。

[石井孝司, 吉崎佐矢香, 李 天成, 武田直和 (阪大微研, 日本・タイ感染症共同研究センター), 脇田隆字]

##### (4) 培養細胞における G1 と G4 HEV の増殖

G1 および G4 HEV を PLC/PRF/5 細胞に接種した後, 細胞を継代せず, 3 日ごとに培地の更新によって細胞を維持した。HEV を接種後の七日目から細胞培養上清中に RNA が検出され経時的に増加した。G1 および G4 HEV 構造蛋白は接種 7 週と 4 週後の培養上清中からそれぞれ検出され, 9 週と 6 週間後にピークに到達し, その

後高いレベルを維持した。この結果から、G1 と G4 HEV も PLC/PRF/5 細胞に感染し増幅することが明らかとなった。また、PLC/PRF/5 細胞で増幅したウイルスをカニクイザルに静脈接種するとウイルスがサル体内で増幅することが確認され、増幅したウイルスが感染性も持つことも明らかになった。HEV 培養系の樹立は HEV 複製のメカニズムを解明するには非常に有用である。

[李 天成, 吉崎佐矢香, 石井孝司, 恒光 裕 (動物衛生研究所), 脇田隆宇, 武田直和 (阪大微研, 日本・タイ感染症共同研究センター)]

#### (5) 培養細胞を用いた HEV の安定性の検討

PLC/PRF/5 細胞で増殖した G1 および G4 HEV を種々の条件で処理した後、PLC/PRF/5 細胞に接種し、経時的に培養上清中のウイルス抗原を ELISA 法で測定して HEV の増殖の有無によりウイルスを失活させる条件を検討した。G3 HEV と同様、ウイルスを失活させる塩素 (NaClO) の有効濃度は 125ppm であった。また、紫外線強度  $50 \mu W$ , 30 分間照射によってもウイルスは完全に失活した。HEV はアルコール、クロロホルムに抵抗性を示した。G1 HEV を  $65^{\circ}C$ , 5 分間加熱処理すると HEV は失活したが、これに対して G4 HEV は  $65^{\circ}C$ , 5 分間加熱されても完全に失活しなかった。G4 HEV を完全に失活するには  $65^{\circ}C$ , 10 分間の加熱処理が必要である。

[李 天成, 吉崎佐矢香, 石井孝司, 脇田隆宇]

#### (6) 不活化 E 型肝炎ワクチンの検討

培養細胞で増殖した遺伝子型 G1, G3, G4 の HEV を  $65^{\circ}C$ , 10 分間熱処理した後、それぞれをウサギとラットに 3 回ずつ大腿筋に接種した。接種後、経時的に採血して ELISA 法で HEV に対する抗体を測定し、さらに免疫血清の中和活性を測定した。熱処理によって不活化した各遺伝子型の HEV をウサギ, ラットに接種すると血中に抗 HEV IgG 抗体が誘導された。抗体価は 1:1,600~25,600 であり、遺伝子型間に抗体価の差が多少見られた。これらの抗体は HEV の PLC/PRF/5 細胞への感染を阻止した。この結果は、不活化 HEV によっ

て誘導された抗体が中和活性を持つことを示唆する。現在サルを用いて不活化ワクチンの検討を継続している。

[李 天成, \*網 康至, \*須崎百合子, \*\*武田直和, 脇田隆宇 (\*動物管理室, \*\*阪大微研, 日本・タイ感染症共同研究センター)]

#### (7) Genotype 5 および 6 HEV 構造蛋白の発現および抗原性の解析

最近、日本に棲息するイノシシから 2 種類の新しい遺伝子型の HEV が発見されたが、その抗原性や病原性などはまだ解析されていない。本研究では組換えバキュロウイルス発現システムを用いて Genotype 5 (G5 HEV) および Genotype 6 HEV (G6 HEV) の構造蛋白を発現し、ウイルス様粒子の形成およびその抗原性の解析を試みた。G5 および G6 HEV ORF2 を RT-PCR 法で増幅し、定法どおり作製した組換えバキュロウイルスを用いて Tn5 細胞で構造蛋白を発現させ、ウイルス様粒子 (HEV-LPs) を作製した。HEV-LPs をウサギとモルモットに免疫し、抗 HEV-VLPs 抗体を獲得した。HEV-LPs を用いて抗体検出 ELISA 法を、抗体を用いて抗原検出 ELISA 法をそれぞれ樹立し、G5 および G6 HEV の抗原性を従前既知の G1, G3, G4 HEV の抗原性と比較している。

[李 天成, \*高橋和明, \*\*片岡紀代, 吉崎佐矢香, \*\*\*網 康至, \*\*\*須崎百合子, 石井孝司, 脇田隆宇, \*三代俊治 (\*東芝病院, \*\*感染病理部, \*\*\*動物管理室)]

#### (8) ラット HEV 構造蛋白の発現および抗原性の解析

最近、ドイツの野生ラットから遺伝子構造上ではヒト HEV と類似するラット HEV が分離されたが、その抗原性や病原性などはまだ解析されていない。本研究では組換えバキュロウイルス発現システムを用いてラット HEV の構造蛋白を発現し、ウイルス様粒子の形成およびその抗原性の解析を行い、ラット HEV 抗体検出法を樹立し、ラット HEV の感染実態を調査する。現在ラット HEV-LPs の作製に成功し、この粒子は既知の G1, G3 G4HEV-LPs との交叉反応を示した。さらに、この粒

子を用いてラット HEV 疫学調査に有用な抗体検出 ELISA 法を樹立した。

[李 天成, \*片岡紀代, \*\*網 康至, \*\*須崎百合子, \*\*\*武田直和, 脇田隆宇 (\*感染病理部, \*\*動物管理室, \*\*\*阪大微研, 日本・タイ感染症共同研究センター)]

#### (9) ラット HEV 疫学調査

日本およびベトナムの野生ラットから血清を採取し、ELISA 法を用いて抗ラット HEV IgG および IgM を検査した。さらに IgM 陽性の血清に対して RT-PCR 法によるラット HEV 遺伝子検査を実施した。その結果、ベトナム野生ラットの抗体保有率は 20%であり、HEV RNA 陽性例も存在していることが判明した。日本野生ラットにおける抗体保有率の調査は進行中である。

[李 天成, \*安田俊平, \*吉松組子, \*有川二郎, 脇田隆宇 (\*北海道大学)]

#### (10) E 型肝炎ウイルスに対するラットの感受性

現在、多種の野生動物から HEV 抗体が検出されているが、遺伝子レベルで HEV の感染が確認されたのは極一部の動物に限られている。最近、ドイツの野生ラットから遺伝子構造上ではヒト HEV と類似するラット HEV が分離されたが、ラット HEV の病原性やヒトへの感染性などの情報はなく、ヒト由来 HEV がラットに感染するかどうかについてもいまだ明らかにされていない。本実験ではヒト HEV, ラット HEV に対するラットの感受性を感染実験で確認し、新しい動物モデルを見いだすことを目的として、Genotype 1, 3, 4 HEV およびラット HEV をラット尾静脈内から接種し、経時的に採血と採便を行った。血液中のウイルス抗原、特異抗体、ウイルス遺伝子、ALT/AST および、便中のウイルス抗原、抗体、およびウイルス遺伝子を測定しウイルスの感染の有無を評価する。現在、感染実験が進行中である。

[李 天成, \*網 康至, \*須崎百合子, 脇田隆宇 (\*動物管理室)]

#### (11) ラット HEV 粒子形成に必須な領域の同定

ラット HEV ORF2 の N 末端から 100 アミノ酸を欠失させた構造蛋白を組換えバキュロウイルスで発現すると、直径約 24nm と 35nm の二種類の中空粒子が産生される。アミノ酸配列解析によって、この粒子蛋白は N 末端の 100 個のアミノ酸以外に C 末端から一部のアミノ酸が欠失していた。構造蛋白の N 末端、あるいは C 末端、さらに両端を欠失した種々のクローンを発現し、VLP 形成に必須な領域の同定を試みている。

[李 天成, 片岡紀代 (感染病理部), 脇田隆宇]

#### (12) サル由来 HEV の感染性および病原性の検討

最近我々はニホンザルから一株の HEV (M-HEV) を分離したが、M-HEV の感染性や病原性などは明らかにされていない。M-HEV の感染性および病原性を解析するため、このウイルスを二頭のカニクイザルに接種し、サル由来 HEV の感染性や病原性などを検討した。M-HEV が含まれるサル糞便乳剤を 45  $\mu$ m フィルターで濾過した後、静脈からカニクイザルに接種し、経時的に採血と採便を行い、ウイルス抗原遺伝子および ALT/AST を経時的に測定してウイルスの感染性を評価した。その結果、血液および便からウイルス遺伝子が検出され、血中に抗 HEV IgG, IgM 抗体が検出され、このウイルスが感染性を有することが明らかになった。ただし、実験過程では ALT/AST の上昇が見られなかったため、病原性に関してさらに検討する必要がある。

[李 天成, \*網 康至, \*須崎百合子, 脇田隆宇 (\*動物管理室)]

#### (13) E 型肝炎ウイルスに対するウサギの感受性

最近、ウサギ飼育場から HEV が分離され、HEV がウサギに感染することが示唆された。本研究では、実験レベルで HEV がウサギに感染するかどうかを確認し、新しい動物モデルを見いだすことを目的とした。G1 および G4 HEV をウサギ静脈内に接種し、経時的に採血と採便を行ない、血液中のウイルス抗原、特異抗体、ウイルス遺伝子、ALT/AST、また、便中のウイルス抗原、抗体、およびウイルス遺伝子を測定しウイルスの感染の有無を評価した。その結果、実験ウサギからウ

ウイルス遺伝子や抗原など検出されず、ALT/ASTの上昇も見られなかった。ヒト由来のG1とG4 HEVはウサギに感染しないことが示唆された。

[李 天成, \*網 康至, \*須崎百合子, 脇田隆宇 (\*動物管理室)]

#### (14) ビリオンサイズのHEV粒子形成とRNAとの関連

これまでに我々は、組換えバキュロウイルスを用いてHEVの構造蛋白を発現し、直径24 nmの小さい粒子と35 nmのビリオンサイズの粒子を作製してきた。ビリオンサイズ粒子にはRNAが取り込まれているのに対して、24 nmの中空粒子にはRNAが含まれていない。クリオ電子顕微鏡を用いて小さい粒子とビリオンサイズ粒子の三次構造を比較したところ、23 nmの粒子は60コピーの構造蛋白から構成される $T=1$ であり、ビリオンサイズ粒子は180コピーの構造蛋白から構成される $T=7$ であることが明らかになった。二種類の粒子の構造蛋白は同じdecameric構成を持っているため、RNAとの結合はHEVのビリオンサイズ粒子の形成に不可欠であることが示唆された。

[李 天成, \*Li Xing, 武田直和, 脇田隆宇, 宮村達男, \*R. Holland Cheng (\* University of California, \*\*大阪大学微生物病研究所, 日本・タイ感染症共同研究センター)]

#### (15) HEV抗原領域の立体構造

精製したHEV-LPsと中和活性を有する抗HEVモノクローナル抗体を結合させ、クリオ電子顕微鏡を用いてHEV抗原領域の立体構造を解析した。抗HEVモノクローナル抗体はPドメインとスパイクの側面に結合していることが明らかになった。また、HEV-LPs結晶構造との分子ドッキングにより、抗HEVモノクローナル抗体はスパイクの先端に結合していることが示された。ORF2のC末端にB細胞タグを付加したキメラHEV-LPでは、B細胞タグに対する抗体と抗HEVモノクローナル抗体の結合部位は異なっていた。外来エピトープが挿入されたHEV-LPsを用いた新たな抗原提示システム

の開発が期待される。

[\*Li Xing, \*Joseph C. Wang, 李 天成, \*\*武田直和, 脇田隆宇, 宮村達男, \*R. Holland Cheng (\* University of California, \*\*阪大微研, 日本・タイ感染症共同研究センター)]

#### IV. 腫瘍ウイルスに関する研究

##### 1. 新規ヒトポリオーマウイルスに関する研究

##### (1) メルケル細胞ポリオーマウイルス(MCV)の糖脂質結合解析と感染細胞系の樹立

昨年度、MCV様粒子と糖脂質との結合をSPR法及びsucrose floatation assayで解析し、GM3, GD3へ結合することを示した。今年度は、MCV VP1から成るレポーター粒子を用いて、ガングリオシド(主にGM3)が正常に合成されているメラノーマ細胞には感染するが、ガングリオシドを合成できない細胞には感染しないことを明らかにした。

[松田麻未, 李 天成, 中西 章(国立長寿医療研究センター), 片野晴隆(感染病理部), 鈴木亮介, 鈴木哲朗(浜松医大), 脇田隆宇]

##### 2. ヒトポリオーマウイルスTSVのウイルス様粒子の作製およびその応用

TSVは最近免疫欠損患者の皮膚から分離された新しいポリオーマウイルスであり、毛孔性丘疹などの発症と関連している。しかしながら、現在までTSVの増殖細胞系は確立されておらず、TSVの生活環、粒子構造などは明らかにされていない。本研究では組換えバキュロウイルス発現システムを用いてTSVのウイルス様粒子(VLP)の作製、精製を試みた。組換えバキュロウイルス感染細胞ではTSV VP1蛋白が産生され、培養上清に放出された。培養上清から直径約20 nmと50 nmの二種類の球形粒子構造が電子顕微鏡で観察された。このVLPを用いてTSV抗体検出ELISA法を樹立した。今後、我が国の健常人におけるTSV抗体保有率を解析し、血清疫学解析を行う予定である。

[李 天成, 片岡紀代(感染病理部), 脇田隆宇, 鈴木哲朗(浜松医大)]

<別> 検査業務

第1室：

検定業務

経口生ポリオウイルスワクチン中間段階

F316 検定 神経毒力試験の再試験

経口生ポリオウイルスワクチン小分け品

Lot51 検定

承認前検査

ロタリックス（平成21年12月から）

ロタテック（平成22年4月から）を実施中。

第2室：

平成22年度は8件の行政検査依頼があり、ウイルス分離同定、塩基配列解析等による型内株鑑別試験等を実施した。型内鑑別あるいは塩基配列解析を行ったポリオウイルスは、すべてワクチン株と同定された。

第5室：

検定業務

乾燥組織培養不活化A型肝炎ワクチン 2件

組換え沈降B型肝炎ワクチン（酵母由来） 6件

行政検査

A型肝炎 11件

E型肝炎 4件

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Yamashita Y, Ootsuka Y, Kondo R, Oseto M, Doi M, Miyamoto T, Ueda T, Kondo H, Tanaka T, Wakita T, Katayama K, Takeda N, Oka T. Molecular characterization of Sapovirus detected in a gastroenteritis outbreak at a wedding hall. *Journal of Medical Virology*. 2010 Apr;82(4): 720-726.
- 2) Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Katayama H, Takeda N, Katayama K, Ohgaki S. Detection and genetic analysis of human sapoviruses in river water in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010 Apr;76(8): 2461-2467.
- 3) Iizuka S, Oka T, Tabara K, Omura T, Katayama K, Takeda N, Noda M. Detection of sapoviruses and noroviruses in an outbreak of gastroenteritis linked genetically to shellfish. *Journal of Medical Virology*. 2010 Jul;82(7): 1247-1254.
- 4) Ueki Y, Shoji M, Okimura Y, Miyota Y, Masago Y, Oka T, Katayama K, Takeda N, Noda M, Miura T, Sano D, Omura T. Detection of sapovirus in oysters. *Microbiology and Immunology* 2010 Aug; 54(8): 483-486.
- 5) Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Takeda N, Sato H, and the Norovirus Surveillance Group of Japan. Divergent Evolution of Norovirus GII/4 by Genome Recombination over 2006-2009 in Japan. *Journal of Virology*. 2010 Aug; 84(16): 8085-8097.
- 6) Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Takeda N, Katayama K, Katayama H. Seasonal distribution and genetic diversity of genogroups I, II, and IV noroviruses in the Tamagawa River, Japan. *Environmental Science & Technology*. 2010 Sep; 44(18): 7116-22.
- 7) Kitajima M, Oka T, Takagi H, Tohya Y, Katayama H, Takeda N, Katayama K. Development and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine noroviruses. *Journal of Virological Methods*. 2010 Nov;169(2): 269-273.
- 8) Bull RA, Hyde J, Mackenzie JM, Hansman GS, Oka T, Takeda N, White PA. Comparison of the replication properties of murine and human calicivirus RNA-dependent RNA polymerases. *Virus Genes*. 2011 Feb; 42(1):
- 9) Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Phanuwat C, Takeda N, Katayama K, Katayama H. Genetic Diversity of Genogroup IV Noroviruses in Wastewater in Japan. *Letters in Applied Microbiology*. 2011 Feb; 52(2): 181-184.
- 10) Oka T, Murakami K, Wakita T, Katayama K. Comparative site-directed mutagenesis in the catalytic amino acid triad in calicivirus proteases. *Microbiology and Immunology*. 2011. Feb; 55(2): 108-114.
- 11) Oka T, Takagi H, Tohya Y, Murakami K, Takeda N, Wakita T, Katayama K. Bioluminescence technologies to detect calicivirus protease activity in cell-free system and in infected cells. *Antiviral Research*. 2011.2.18. Equib ahead of print.
- 12) Someya Y, Takeda N. Functional Consequences of Mutational Analysis of Norovirus Protease. *FEBS Lett*. 585(2): 369-374, 2011.
- 13) Shirato H. Norovirus and Histo-blood Group Antigens. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 64: 95-103, 2011.
- 14) Sharp, T. M., Guix, S., Katayama K., Crawford,

- S. E., Estes, M. K. Inhibition of Cellular Protein Secretion by Norwalk Virus Nonstructural Protein p22 Requires a Mimic of an Endoplasmic Reticulum Export Signal. *PLoS ONE* 5(10): e13130, 2010.
- 15) Arita M, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Wakita T, Shimizu H. Phosphatidylinositol-4 kinase III beta is a target of enviroxime-like compounds for anti-poliovirus activity. *J Virol* 85 (5): 2364-2372. 2011.
- 16) Himeda T, Hosomi T, Asif N, Shimizu H, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y: The preparation of an infectious full-length cDNA clone of Saffold virus. *Virol J* 8: 110, 2011.
- 17) Sun LM, Zheng HY, Zheng HZ, Guo X, He JF, Guan DW, Kang M, Liu Z, Ke CW, Li JS, Liu L, Guo RN, Yoshida H, Lin JY. An enterovirus 71 epidemic in guangdong province of china, 2008: epidemiological, clinical, and virogenic manifestations. *Jpn J Infect Dis* 64 (1): 13-18. 2011.
- 18) Miyamura K, Nishimura Y, Abo M, Wakita T, Shimizu H: Adaptive mutations in the genomes of enterovirus 71 strains following infection of mouse cells expressing human P-selectin glycoprotein ligand-1. *J Gen Virol* 92(2): 287-291. 2011.
- 19) Pham NTK, Takanashi S, Tran DN, Abeysekera C, Abeygunawardene A, Khamrin P, Okitsu S, Shimizu H, Mizuguchi M, Ushijima H. Human parechovirus infection in children hospitalized with acute gastroenteritis in Sri Lanka. *J Clin Microbiol* 49(1): 364-366. 2011.
- 20) Nishimura K, Wakita T, Shimizu H. Tyrosine sulfation of the amino terminus of PSGL-1 is critical for enterovirus 71 infection. *PLoS Pathog* 6(11): e1001174. 2010.
- 21) Arita M, Masujima S, Wakita T, Shimizu H. Development of a particle agglutination method with soluble virus receptor for identification of poliovirus. *J Clin Microbiol* 48(8): 2698-2702. 2010.
- 22) Miyoshi M, Yoshizumi S, Jinushi M, Ishida S, Okui T, Okano M, Shouji M, Tanaka S, Saigusa J, Mori A, Tanabe H, Yamaguchi R, Nishimura Y, Shimizu H. A case of paralytic poliomyelitis associated with poliovirus vaccine strains in Hokkaido, Japan. *Jpn J Infect Dis* 63(3):216-217. 2010.
- 23) Arita M, Takebe Y, Wakita T, Shimizu H. A bifunctional anti-enterovirus compound that inhibits replication and early stage of enterovirus 71 infection. *J Gen Virol*. 91 (11): 2734-44. 2010.
- 24) Murayama A, Weng L, Date T, Akazawa D, Tian X, Suzuki T, Kato T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T, Toyoda T: RNA Polymerase Activity and Specific RNA Structure are Required for Efficient HCV Replication in Cultured Cells. *PLoS Pathog*. 2010 Apr 29; 6(4): e1000885.
- 25) Takahashi H, Akazawa D, Kato T, Date T, Shirakura M, Nakamura N, Mochizuki H, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Suzuki T, Wakita T. Biological properties of purified recombinant HCV particles with an epitope-tagged envelope. *Biochem Biophys Res Commun*. 395: 565-71, 2010.
- 26) Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori K, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. *J Virol* 2010;84: 5824-5835.
- 27) Yamamoto M, Sakamoto N, Nakamura T, Itsui Y, Nakagawa M, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S,

- Azuma S, Tsuchiya K, Kato T, Wakita T, Watanabe M. Studies on virus kinetics using infectious fluorescence-tagged hepatitis C virus cell culture. *Hepatol Res.* 41: 258-69, 2011.
- 28) Watashi K, Yeung ML, Starost MF, Hosmane RS, Jeang KT. Identification of small molecules that suppress microRNA function and reverse tumorigenesis. *J Biol Chem* 285(32): 24707-24716, 2010.
- 29) Watashi K. Alisporivir, a cyclosporin derivative that selectively inhibits cyclophilin, for the treatment of HCV infection. *Curr Opin Investig Drugs* 11(2): 213-224, 2010.
- 30) Weng L, Hirata Y, Arai M, Kohara M, Wakita T, Watashi K, Shimotohno K, He Y, Zhong J, Toyoda T. Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype-specific manner. *J Virol* 84(22): 11761-11770, 2010.
- 31) Moriishi K, Shoji I, Mori Y, Suzuki R, Suzuki T, Kataoka C, Matsuura Y. Involvement of PA28gamma in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology.* 52: 411-420, 2010.
- 32) Watanabe N, Aizaki H, Matsuura T, Kojima S, Wakita T, Suzuki T: Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of extracellular matrix-related molecules, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 407: 135-40, 2011.
- 33) Inoue Y, Aizaki H, Hara H, Matsuda M, Ando T, Shimoji T, Murakami K, Masaki T, Shoji I, Homma S, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology.* 410: 38-47, 2011.
- 34) Hmwe SS, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Suzuki T. Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. *Antiviral Res.* 85: 520-4, 2010.
- 35) Xing L., Wang J. C., Li T. C., Yasutomi Y., Lara J., Khudyakov Y., Schofield D., Emerson S. U., Purcell R. H., Takeda N., Miyamura T., Cheng R. H. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. *Journal of Virology,* 85: 1117-1124, 2011.
- 36) Li T. C., Song S. Yang Q., Ishii K., Takeda N., and Wakita T. A cell culture system for hepatitis E virus. *Hepatology International.* 5: 202, 2011.
- 37) Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Shimada T., Nakamura N., Tada Y., Noda M. and Wakita T. Epidemiological and genetic analysis of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. *Hepatology International.* 5: 204-205, 2011.
- 38) Akazawa D., Morikawa K., Omi N., Takahashi H., Nakamura N., Mochizuki H., Date T., Ishii K., Suzuki T. and Wakita T. Production and Characterization of Hepatitis C Virus Particles from Serum-free Culture. *Vaccine,* 29: 4821-4828, 2011.
- 39) Yoshida T., Miyasaka T., Azegami Y., Uchiyama Y., Kasahara H., Ueda H., Nagase H., Fujita S., Ishii K. and Noda M. Investigation of epidemiology and HAV genomes regarding three hepatitis A infections that occurred in April-May, 2010-Nagano. *Japanese Journal of Infectious Diseases,* 64: 260-261, 2011.
- 40) Yang L., Kiyohara T., Kanda T., Imazeki F., Fujiwara K., Gauss-Muller V., Ishii K., Wakita T., Yokosuka O. Inhibitory effects on HAV IRES-mediated translation and

- replication by a combination of amantadine and interferon- $\alpha$ . *Virology Journal*, 7: 212, 2010.
- 41) Zhang Y.Y., Zhang B.H., Ishii K. and Liang T. J. A novel function of CD81 in controlling hepatitis C virus replication. *Journal of Virology*, 84: 3396-3407, 2010.
- 42) Li T.C., Xing L., Mayazaki N., Simon M.N., Wall J.S., Moore M., Wang C.Y., Takeda N., Wakita T., Miyamura T., Cheng R.H. Structure of hepatitis E virion-sized particle reveals an RNA-dependent viral assembly pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 285: 33175-33183, 2010.
- 43) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Mechanism of action of ribavirin in a novel hepatitis C virus replication cell system. *Virus Res.* 2011 157(1): 61-70
- 44) Ariumi Y, Kuroki M, Maki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. The ESCRT system is required for hepatitis C virus production. *PLoS One.* 2011 Jan 11;6(1): e14517.
- 45) Hishiki T, Shimizu Y, Tobita R, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H, Wakita T, Baumert TF, Miyanari Y, Shimotohno K. Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms. *J Virol.* 2010 84(22): 12048-57.
- 46) von dem Bussche A, Machida R, Li K, Loevinsohn G, Khandar A, Wang J, Wakita T, Wands JR, Li J. Hepatitis C virus NS2 protein triggers endoplasmic reticulum stress and suppresses its own viral replication. *J Hepatol.* 2010 53(5): 797-804.
- 47) Mishima K, Sakamoto N, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Kiyohashi K, Kitazume A, Tsuchiya K, Imamura M, Hiraga N, Chayama K, Wakita T, Watanabe M. Cell culture and in vivo analyses of cytopathic hepatitis C virus mutants. *Virology.* 2010 405(2): 361-9.
- 48) Podevin P, Carpentier A, Pène V, Aoudjehane L, Carrière M, Zaïdi S, Hernandez C, Calle V, Méritet JF, Scatton O, Dreux M, Cosset FL, Wakita T, Bartenschlager R, Demignot S, Conti F, Rosenberg AR, Calmus Y. Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. *Gastroenterology.* 2010 139(4): 1355-64.
- 49) Kushima Y, Wakita T, Hijikata M. A disulfide-bonded dimer of the core protein of hepatitis C virus is important for virus-like particle production. *J Virol.* 2010 84(18): 9118-27.
- 50) Banaudha K, Orenstein JM, Korolnek T, St Laurent GC 3rd, Wakita T, Kumar A. Primary hepatocyte culture supports hepatitis C virus replication: a model for infection-associated hepatocarcinogenesis. *Hepatology.* 2010 51(6): 1922-32.
- 51) Shirasaki T, Honda M, Mizuno H, Shimakami T, Okada H, Sakai Y, Murakami S, Wakita T, Kaneko S. La protein required for internal ribosome entry site-directed translation is a potential therapeutic target for hepatitis C virus replication. *J Infect Dis.* 2010 202(1): 75-85.
- 52) Arnaud N, Dabo S, Maillard P, Budkowska A, Kalliampakou KI, Mavromara P, Garcin D, Hugon J, Gatignol A, Akazawa D, Wakita T, Meurs EF. Hepatitis C virus controls interferon production through PKR activation. *PLoS One.* 2010 5(5): e10575.

- 1) 片山和彦, 岡智一郎, 高木弘隆: ノロウイルス研究の現状とマウスノロウイルス研究の有用性. 日本実験動物協会誌「LABIO21」, No. 39, 20-26, 2010.
- 2) 片山和彦: ノロウイルス感染症研究の現状と課題. 「食品衛生研究」平成 22 年 10 月 5 日発行, vol 60, 15-26, 2010.
- 3) 3) 岡智一郎, 片山和彦, 小林慎一, 飯高順子, 野田 衛: 愛知県と川崎市の食中毒事例から検出されたサポウイルス. GI/2の塩基配列の比較 “ 病原体微生物情報 (IASR) Vol. 31, 13-14: 2010 年 11 月号.
- 4) 岡智一郎: ノロウイルス, サポウイルス「臨床検査ガイド 2011-2012」, 758-759. 文光堂.
- 5) 染谷雄一: ノロウイルスプロテアーゼの構造と機能, 化学療法の領域 5 月号 26(5): 835-841, 2010, 医薬ジャーナル社.
- 6) 高山直秀, 崎山 弘, 清水博之, 宮村達男, 岡部信彦 梅本 哲: 麻疹ワクチン, 風疹ワクチン, ポリオ生ワクチン全国累積接種率 - 2008 年度調査結果-. 小児科臨床 63: 1127-1134. 2010.
- 7) 清水博之: 世界ポリオ根絶の失われた 10 年とポリオ根絶計画のこれから. ウイルス 60: 49-58, 2010.
- 8) 藤本嗣人, 花岡 希, 安井良則, 小長谷昌未, 岡部信彦, 高崎智彦, 清水博之: エンテロウイルス遺伝子が検出され EV71 抗体上昇が確認された急性脳炎(辺縁系脳炎)症例. 病原微生物検出情報 31: 235, 2010.
- 9) 岩井雅恵, 堀元栄詞, 小原真弓, 小渕正次, 倉田毅, 滝澤剛則, 川越久美子, 中村純香, 清水博之, 吉田 弘: 2010 年に富山県で検出されたエコーウイルス 30 型の遺伝子解析. 病原微生物検出情報 31: 298-300, 2010.
- 10) 清水博之: 不活化ポリオワクチン. 小児内科 42: 1949-1952, 2010.
- 11) 清水博之: ポリオウイルス. 日本臨床 68: 422-426, 2010.
- 12) 清水博之: エンテロウイルス. 日本臨床 68: 427-430, 2010.
- 13) 清水博之, 「急性灰白髄炎(ポリオ)」の項を担当, 分子予防環境医学研究会編, 分子予防環境医学, 改訂版 201-209, 東京, 本の泉社, 2010.
- 14) 清水博之, 「急性灰白髄炎とポリオ様疾患」の項を担当, 家庭医学大全科, 六訂版 2632-2633, 東京, 法研, 2010.
- 15) 政木隆博, 松永智子, 高橋宏隆, 加藤孝宣, 遠藤弥重太, 脇田隆宇, 澤崎達也, 鈴木哲朗: HCV NS5A 蛋白質のリン酸化に関与する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの探索. 消化器内科 51: 627-631, 2010.
- 16) 鈴木哲朗, 原 弘道, 相崎英樹, 鈴木亮介, 政木隆博: C 型肝炎ウイルスの複製と粒子形成. ウイルス 60: 87-92, 2010.
- 17) 渡士幸一: 解明されたシクロスポリンの新規作用 - 抗 HCV 作用, 今日の移植 23(6): 716-721, 2010.
- 18) 鈴木哲朗, 原 弘道, 相崎英樹, 鈴木亮介, 政木隆博: C 型肝炎ウイルスの複製と粒子形成, ウイルス 60:87-92, 2010.
- 19) 相崎英樹, 鈴木哲朗, 脇田隆宇: HCV 生活環における脂質の役割, 日本臨床 69(4): 59-63, 2011.
- 20) 道免和文, 小野原伸也, 田中博文, 春野政虎, 下田慎治, 姜 貞憲, 石井孝司, 高橋和明: 2010 年 A 型肝炎ウイルス福岡株に対する分子疫学的検討-1999 年ボルネオ(カリマンタン) 島由来株との近縁性. 肝臓 印刷中, 2011.
- 21) 石井孝司: A 型肝炎ウイルスのウイルス学的特徴, 日本臨床 69:559-565, 2011.
- 22) 石井孝司, 李 天成: E 型肝炎. 公衆衛生, 75: 43-46, 2011.
- 23) 清原知子, 石井孝司: ファクトシート(案) 1. A 型肝炎. 食品により媒介される感染症等に関する文献調査報告書: 社団法人 畜産技術協会, 255-259, 2010. 3.
- 24) 清原知子, 石井孝司: A 型肝炎-ウイルス感染に

- よる食中毒- 婦人之友 8月号: 110-114, 2010.
- 25) 清原知子, 石井孝司: 新時代のワクチン戦略について考える. A型肝炎 臨床検査, 54: 1383-1391, 2010.
- 26) 清原知子, 石井孝司, 脇田隆字, 中村奈緒美, 島田智恵, 中島一敏, 多田有希: 我が国におけるA型肝炎の血清疫学. IASR 31(10): 3-4, 2010.
- 27) 石井孝司, 清原知子, 吉崎佐矢香, 脇田隆字, 島田智恵, 中村奈緒美, 多田有希, 野田 衛, 三上稔之, 齊藤哲也, 山崎彰美, 清水英明, 宇宿秀三, 長岡宏美, 吉田徹也, 岡村雄一郎, 小原真弓, 柴田伸一郎, 楠原 一, 近野真由美, 入谷展弘, 奴久妻聡一, 川西伸也, 榊原啓子, 榎本義正, 岡本玲子, 世良暢之, 川本大輔, 増本久人, 上村晃秀, 佐藤知子: 2010年春季に日本で多発したA型肝炎の分子疫学的解析. IASR 31(10): 4-6, 2010.
- 28) 野田 衛, 石井孝司, 片山和彦, 多田有希, 中島一敏, 島田智恵, 中村奈緒美, 岡部信彦, 田中 誠, 熊谷優子: 自治体間におけるA型肝炎ウイルスの分子的, 疫学的データの共有体制 (V-nus net Japan) の構築: その目的と意義. IASR 31(10): 6-8, 2010.
- 29) 李 天成: E型肝炎ウイルスマーカー. 肝胆膵 60: 661-667, 2010.
- 30) 李 天成: E型肝炎. 臨床検査 増刊号 54: 1453-1458, 2010.
- 31) 脇田隆字: 期待されているこれからのワクチン: C型肝炎 臨床検査 2010 54(11): 1447-1452.
- 32) 脇田隆字: HCVの増殖メカニズムの解明 最新医学 2010 65(9): 1870-1875.
- 33) 脇田隆字, 村山麻子: C型肝炎ウイルスの複製機構 Medical Science Digest 2010 36(8): 912-915.
- 34) 脇田隆字: HCV培養系 Medical Practice 2010 27(1): 111-112.
- 1) Country Progress Report on Maintaining Polio-free Status, Japan: WHO report, 2010.
- 2) 国立感染症研究所: ポリオワクチンに関するファクトシート, 2010年7月7日版 (<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r985200000bx23-att/2r9852000000bybl.pdf>), 2011.
- 3) 厚生科学審議会感染症分科会予防接種部会ワクチン評価に関する小委員会, ポリオワクチン作業チーム: ポリオワクチン作業チーム報告書 (<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000014wdd-att/2r98520000016rr8.pdf>), 2011.

## II. 学会発表

### 国際学会

- 1) Oka T, Yokoyama M, Takagi H, Tohya Y, Motomura K, Murakami K, Wakita T, Sato H, Katayama K: Antiviral development. Fourth International Conference on Caliciviruses. State-of-the Art. October 16-19, 2010, Santa Cruz, Chile.
- 2) Murakami K, Oka T, Wakita T, Matsuda T, Katayama K: Analysis of mechanism of human norovirus binding to Caco-2 cells. Fourth International Conference on Caliciviruses. October 16-19, 2010, Santa Cruz, Chile.
- 3) Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Sato H, and Norovirus Surveillance Group of Japan: Evolution of norovirus GII/4 in Japan by genome recombination. Fourth International Conference on Caliciviruses. October 16-19, 2010, Santa Cruz, Chile.
- 4) Yokoyama M, Oka T, Katayama K, Kanda T, Sato H: Structural insight into substrate recognition based on P4 and P1 residues by sapovirus 3C-like protease. Fourth International Conference on Caliciviruses. October 16-19, 2010, Santa Cruz, Chile.

### 3. その他

- 5) Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Takeda N, Katayama K, Katayama H: Genetic diversity of human noroviruses and sapoviruses in river water, Japan. Fourth International Conference on Caliciviruses. October 16-19, 2010, Santa Cruz, Chile.
- 6) Hnasman, G.S. Chen, L. Georgeiv, I. McLellan, J.S. Katayama, K. Kwong, P.D.: Crystal structures of a rare norovirus P-Domain in complex with Histo-Blood Group antigens. 4th International Conference on Caliciviruses. Santa Cruz, Chile, Oct 16-19, 2010.
- 7) Harada S, Nishimura K, Kiyota N, Matsumoto K, Yahiro S, Okada M, Katayama K, Oka T: Surveillance of pathogens in outpatients with gastroenteritis and genetic analysis of sapovirus strains between 2002 and 2009 in Kumamoto Prefecture, Japan. 16<sup>th</sup> Federation of Asian Veterinary Associations Congress 2011 February 16-18, 2011. Cebu City, Philippines.
- 8) Shirato H and Narimatsu H: Noroviruses distinguish type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. 1st Asia Pacific Workshop on Neurovirology Seoul 2010. Seoul National University in Seoul, 2010. 7.
- 9) Katayama K: The newly identified human Norovirus strain HK299 may be recombinant between genogroups. 44<sup>th</sup> Joint Working Conference on Viral Diseases. US-Japan Cooperative Medical Science Program, Centennial Hall, Hokkaido University, Sapporo Japan. June 28-30, 2010.
- 10) Nishimura Y, Wakita T, Shimizu H: Tyrosine sulfation of the amino terminus of PSGL-1 is critical for enterovirus 71 infection. 16th Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses. Scotland, 2010.9.11-16.
- 11) Asif N, Hosomi T, Nishimura Y, Umami RN, Kobayashi S, Zaidi S, Shimizu H: Human Cardioviruses (Saffold viruses): Epidemiology of different genotypes and growth in cell culture, 16th Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses. Scotland, 2010.9.11-16.
- 12) Mistry N, Inoue H, Storm R, Shimizu H, Koike S, Arnberg N: Coxsackievirus A24 variant uses O-linked glycoconjugates with terminal sialic acid as cellular receptors on human ocular cells. 16th Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses. Scotland, 2010.9.11-16.
- 13) Nishimura Y, Miyamura K, Shimizu H: Characterization of cellular and viral factors involved in PSGL-1-dependent viral replication of enterovirus 71. EV71 workshop at National Cheng Kung University, Taiwan, 2010. 10. 9
- 14) Nishimura Y, Miyamura K, Shimizu H: Involvement of host and viral factors for interaction of PSGL-1 with enterovirus 71. The 2<sup>nd</sup> International Vaccine Symposium, Taiwan, 2010, 10. 7-8.
- 15) Murayama A, Date T, Kato T, Wakita T: An adaptive mutation in NS4A region enhances Hepatitis C Virus replication and virus production in cell culture. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Japan, 2010. 9.10-14.
- 16) Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Kato T, Endo Y, Sawasaki T, Wakita T, Suzuki T: Identification of novel hepatitis C virus NS5A-associated protein kinases. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus

- and Related Viruses, Yokohama, Japan, 2010. 9.10-14.
- 17) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Kato T, Watanabe H, Wakita T: Effects of NS5A replacement in HCV JFH-1 genome on viral replication and infectious particle production in cell culture. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Japan, 2010. 9.10-14.
- 18) Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Tomonaga M, Masaki T, Kato T, Wakita T, Suzuki T: Role of ERAD pathway in quality control of HCV envelope proteins and maturation of the viral particles. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Japan, 2010.9.10-14.
- 19) Watanabe N, Murayama A, Saeed M, Date T, Kato T, Wakita T. Analysis of envelope N-glycans required for HCV lifecycle. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Japan, 2010.9.10-14.
- 20) Watashi K, Shimotohno K, Jeang KT, Wakita T: Inhibition of HCV replication by small molecule that suppresses microRNA pathway. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Japan, 2010.9.10-14.
- 21) Suzuki R, Akazawa D, Ishii K, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T: Efficient production of trans-complemented hepatitis C virus particles: Use for study of viral entry process. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Japan, 2010. 9. 10-14.
- 22) Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Tomonaga M, Masaki T, Kato T, Wakita T, Suzuki T: Role of ERAD pathway in quality control of HCV envelope proteins and maturation of the viral particles. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Japan, 2010. 9. 10-14.
- 23) Moriishi K, Shoji I, Mori Y, Suzuki R, Suzuki T, Kataoka C, Matsuura Y: Involvement of PA28gamma in the propagation of HCV. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Japan, 2010.9.10-14.
- 24) Watanabe N, Murayama A, Saeed M, Date T, Kato T, Wakita T: Analysis of envelope N-glycans required for HCV lifecycle, 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Japan, 2010.9.10-14.
- 25) Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T, Suzuki T: Real-time visualization of the ATP level in HCV replicating cells. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Japan, 2010.9.10-14.
- 26) Moriyama M, Akazawa D, Yokokawa H, Nishimura K, Nakamura N, Mochizuki H, Suzuki T, Kato T, Ishii K and Wakita T: The exploration of effective adjuvant for HCV vaccine to induce neutralizing immunoglobulin in mice. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, Japan, 2010.9.10-14.
- 27) Suzuki R, Akazawa D, Ishii K, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T: Use of *trans*-complemented hepatitis C virus particles for study of viral entry process. 9th International Symposium on Positive-strand RNA Viruses. Atlanta, USA, 2010.5.

- 28) Ishii K, Kiyohara T, Yoshizaki S, Shimada C, Nakamura N, Tada Y, Noda M, Wakita T: Epidemiological and genetic analysis of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Bangkok, Thailand, 2011.2.17-20.
- 29) Li TC, Song S, Yang Q, Ishii K, Takeda N, Wakita T: The stability and inactivation of hepatitis E virus grown in cell culture. Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Bangkok, Thailand, 2011.2.17-20.
- 30) Ishii K: Surveillance of hepatitis A virus in Japan. Research Forum for the Tohoku-RITM Collaborating Research Center for Emerging and Reemerging Infectious Diseases. Manila, Philippines, 2010.12.10.
- 31) Li TC: Recombinant Baculovirus Expression System for Vaccine Development. 2010 Wuhan International Symposium on Vaccines - Key Progress in Vaccine Technology. Wuhan, China, 2010.10.12-14.
- 32) Yokokawa H, Akazawa D, Moriyama M, Nakamura N, Mochizuki H, Suzuki T, Kato T, Ishii K, Wakita T: Development of a purification method of highly purified HCV virion for industrial production. 17th International Meeting on HCV and Related Viruses, Yokohama, Japan, 2010.9.10-14.
- 33) Moriyama M, Akazawa D, Yokokawa H, Nishimura K, Nakamura N, Mochizuki H, Suzuki T, Kato T, Ishii K, Wakita T: The exploration of effective adjuvant for HCV vaccine to induce neutralizing immunoglobulin in mice. 17th International Meeting on HCV and Related Viruses, Yokohama, Japan, 2010.9.10-14.
- 34) Suzuki R, Akazawa D, Ishii K, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T: Efficient production of trans-complemented hepatitis C virus particles: Use for study of viral entry process. 17th International Meeting on HCV and Related Viruses, Yokohama, Japan, 2010.9.10-14.
- 35) Li TC: Vaccine Development Employing Using Virus-like Particles and Cell Culture System. United-States Japan Cooperative Medical Science Program, Workshop on Enteric Viral Hepatitis A and E in Asia. Yokohama, Japan, 2010.9.10-14.
- 36) Ishii K: Surveillance of HAV infection in Japan. United-States Japan Cooperative Medical Science Program, Workshop on Enteric Viral Hepatitis A and E in Asia. Yokohama, Japan, 2010.9.10-14.
- 37) Li TC, Ishii K, Miyamura T, Takeda N, Wakita T: Establish a cell culture system for hepatitis E virus. The Eighth China-Japan International Conference of Virology. Harbin, China, 2010.6.4-7.
- 38) Li TC, Liu R, Yoshizaki S, Ishii K, Miyamura T, Takeda N, Wakita T: The stability and inactivation of hepatitis E virus grown in cell culture. 9th International Symposium on Positive-Strand RNA Viruses, Atlanta, USA, 2010.5.17-22.
- 39) Suzuki R, Akazawa D, Ishii K, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T: Use of trans-complemented hepatitis C virus particles for study of viral entry process. 9th International Symposium on Positive-Strand RNA Viruses, Atlanta, USA, 2010.5.17-22.
- 40) Wakita T: HCV replication and persistent infection, Cold Spring Harbor Asia Conference on Emerging Infectious Diseases: Emerging Viruses and the Control of Viruses, Cold

Spring Harbor Asia Conference, Suzhou Dushu Lake Conference Center, Suzhou, China, 2010.10.18-22.

- 41) Wakita T: HCV replication in vitro. The 7th Single Topic Conference: Hepatitis C Virus, Asia Pacific Association of the Study of the Liver (APASL), Chiba, Japan, 2010.12.17-18.

## 2. 国内学会

- 1) 浅野有香, 村上耕介, 鈴木さやか, 灘野大太, 宇理須厚雄, 岡智一郎, 片山和彦, 松田 幹「母乳に含まれるヒトノロウイルス感染抑制因子の探索」日本農芸化学会中部支部第 159 回例会 2010.10.30. 名古屋.
- 2) 白土東子: ノロウイルスによる血液型抗原の識別. 第 5 回糖鎖産業技術フォーラム, 2010.9.
- 3) 白土東子, 伊藤浩美, 久保田智巳: 糖鎖ライブラリーとそれを利用したノロウイルスの糖鎖認識機構の解析. 第 8 回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム, 2010.11.
- 4) 岡智一郎: 「カリシウイルスの新知見」ウイルス性下痢症研究会第 22 回学術集会 2010.11.6. 徳島.
- 5) 岡智一郎, 高木弘隆, 遠矢幸伸, 村上耕介, 脇田隆字, 片山和彦: ネコカリシウイルスの新規リバースジェネティクス系の構築. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010.11.7-9, 徳島.
- 6) 北島正章, 岡智一郎, 原本英司, 武田直和, 片山和彦, 片山浩之: 国内の下水および河川水からの GenogroupIV ノロウイルスの検出および遺伝子解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010.11.7-9, 徳島.
- 7) 村上耕介, 岡智一郎, 脇田隆字, 松田 幹, 片山和彦: ノロウイルスのヒト腸管由来細胞への結合様式の解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010.11.7-9, 徳島.
- 8) 斎藤博之, 東方美保, 岡智一郎, 片山和彦, 田中智之, 野田 衛: 食品検体のノロウイルス検

査のためのパンソルビン・トラップ法の開発と拡大適用. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010.11.7-9, 徳島.

- 9) 原田誠也, 西村浩一, 岡智一郎, 片山和彦: 「熊本県における感染性胃腸炎の起因病原体調査とサポウイルス genogroup の年次変化」第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010.11.7-9, 徳島.
- 10) 高木弘隆, 北島正章, 遠矢幸伸, 岡智一郎, 片山浩之, 片山和彦, 杉山和良: マウスノロウイルス(MNV)のマウス由来培養細胞での増殖性についての検討. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010.11.7-9, 徳島.
- 11) 野田 衛, 入谷展弘, 中田恵子, 斎藤博之, 田中忍, 西川 篤, 北堀吉映, 三谷亜里子, 三瀬敬治, 山下和予, 岡智一郎, 片山和彦, 岡部信彦: 関西で同時多発的に発生したノロウイルス食中毒事例の解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010.11.7-9, 徳島.
- 12) 北元憲利, 岡智一郎, 片山和彦, Hansman GS, 三好龍也, 田中智之: サポウイルスに対する単クローン抗体の解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010.11.7-9, 徳島.
- 13) 斎藤博之, 東方美保, 岡智一郎, 片山和彦, 田中智之, 野田 衛: 食品検体のノロウイルス検査を目的としたパンソルビン・トラップ法の開発. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010.11.7-9, 徳島.
- 14) 染谷雄一, 白土東子, 脇田隆字: ノロウイルス様中空粒子アセンブリに影響を与えるドメイン間相互作用, 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010.11.7-9.
- 15) 白土東子, 熊谷安希子, 伊藤浩美, 古川早苗, 成松久, 石井孝司, 染谷雄一, 脇田隆字, 久保田智巳: X線結晶構造解析によるノロウイルスと血液型抗原の結合解析, 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010.11.7-9.
- 16) 守口匡子, 白土東子, 染谷雄一, 奥野良信, 黒澤良和, 谷口孝喜: フェージディスプレイ法に

- よる, ヒト型抗ノロウイルス抗体の単離, 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010. 11. 7-9.
- 17) 下池貴志, 野島清子, 脇田隆字, 岡田義昭: 血液製剤における C 型肝炎ウイルスの不活化の検討. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010. 11.
- 18) 久保田智巳, 熊谷安希子, 古川早苗, 伊藤浩美, 成松久, 石井孝司, 染谷雄一, 脇田隆字, 白土東子: ノロウイルスによるフコース認識の分子基盤, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 兵庫, 2010. 12. 7-10.
- 19) 守口匡子, 白土東子, 染谷雄一, 奥野良信, 黒澤良和, 谷口孝喜: フェージディスプレイ法による広域遺伝子型反応性ヒト型抗ノロウイルス抗体の単離. 日本薬学会第 131 年会, 静岡, 2011. 3. 29-31.
- 20) 野田 衛, 片山和彦, 石井孝司, 岡智一郎, 多田有希, 山下和予, 三瀬敬治, 地方衛生研究所, 中村奈緒美, 島田智恵, 岡部信彦: 塩基配列情報共有化の食品媒介ウイルス感染症の疫学調査への応用. 第 3 1 回日本食品微生物学会総会, 2010. 11. 11-12, 滋賀.
- 21) 村上耕介, 岡智一郎, 脇田隆字, 松田 幹, 片山和彦: ノロウイルスのヒト腸管由来培養細胞への結合様式. 第 3 3 回日本分子生物学会年会・第 8 3 回日本生化学会大会合同大会, 2010. 12. 7-10, 神戸.
- 22) 岡智一郎, 横山 勝, 高木弘隆, 本村和嗣, 村上耕介, 佐藤裕徳, 脇田隆字, 片山和彦: カリシウイルスプロテアーゼ catalytic triad 形成残基のポリプロテイン切断活性への重要性. 第 3 3 回日本分子生物学会年会・第 8 3 回日本生化学会大会合同大会, 2010. 12. 7-10, 神戸.
- 23) 片山和彦: 今, 問題の食中毒. 日本獣医公衆衛生学会 シンポジウム, 2010. 1. 31, 宮崎市.
- 24) 岡智一郎, 高木弘隆, 脇田隆字, 片山和彦: ルシフェラーゼセンサーテクノロジーを用いたネコカリシウイルス感染検出系の構築. 日本薬学会第 130 年会, 2010. 3. 28-30, 岡山.
- 25) 片山和彦: 感染症の動物モデルを考える. マウスノロウイルスとヒトノロウイルス. 第 57 回日本実験動物学会シンポジウム, 2010. 5. 12, 京都市.
- 26) 片山和彦: 第 31 回衛生微生物技術協議会, 2010. 5. 25-26, 鹿児島市.
- 27) 吉田弘: エンテロウイルス感染症の遺伝子診断. 地方衛生研究所全国協議会 第 2 5 回関東甲信静支部ウイルス研究部会, 横浜, 2010. 10 月
- 28) 吉田弘: リファレンス活動を通じた地方衛生研究所との連携について. 学友会シンポジウム, 東京, 2010. 11. 18
- 29) 有田峰太郎, 増島操治, 脇田隆字, 清水博之: ポリオウイルス同定のための新規ゼラチン粒子凝集法の開発. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010. 11. 7-9.
- 30) 有田峰太郎, 武部豊, 脇田隆字, 清水博之: 2 つの作用点を持つ新規抗エンテロウイルス化合物の解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010. 11. 7-9.
- 31) 西村順裕, 脇田隆字, 清水博之: コクサッキー A16 型ウイルスの白血球系細胞株における増殖の解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010. 11. 7-9.
- 32) 吾郷昌信, 山口顕徳, 平野学, 吉川亮, 西村順裕, 清水博之: ヒトライノウイルスの高感度検出同定法. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010. 11. 7-9.
- 33) 町田早苗, 西村順裕, 清水博之: 無菌性髄膜炎を疑う熱性痙攣小児患者からのエンテロウイルスの検出. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010. 11. 7-9.
- 34) 村山麻子, 伊達朋子, 加藤孝宣, 脇田隆字: C 型肝炎ウイルス J6CF 株の培養細胞での増殖に必要なウイルス遺伝子変異の同定. 第 58 回日本

- ウイルス学会学術集会，徳島，2010.11.7-9.
- 35) 政木隆博，松永智子，高橋宏隆，加藤孝宣，遠藤弥重太，澤崎達也，脇田隆字，鈴木哲朗：HCV NS5A 蛋白のリン酸化に関与する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの同定と機能解析. 第 58 回 日本ウイルス学会学術集会，徳島，2010.11.7-9.
- 36) 加藤孝宣，岡本有加，村山麻子，政木隆博，脇田隆字：HCV の増殖適応変異とその意義. 第 58 回 日本ウイルス学会学術集会，徳島，2010.11.7-9.
- 37) 加藤孝宣，Saeed Mohsan，脇田隆字：C 型肝炎ウイルス JFH-1 株患者血清のチンパンジーへの感染実験. 第 58 回 日本ウイルス学会学術集会，徳島，2010.11.7-9.
- 38) 岡本有加，政木隆博，村山麻子，加藤孝宣，渡邊治雄，脇田隆字：HCV JFH-1 株における NS5A の置換がウイルス増殖に及ぼす影響の解析. 第 58 回 日本ウイルス学会学術集会，徳島，2010.11.7-9.
- 39) Saeed Mohsan，鈴木亮介，渡邊則幸，政木隆博，加藤孝宣，脇田隆字，鈴木哲朗：Role of ERAD pathway in life cycle of hepatitis C virus. 第 58 回 日本ウイルス学会学術集会，徳島，2010.11.7-9.
- 40) 渡邊則幸，村山麻子，Saeed Mohsan，伊達朋子，加藤孝宣，相崎英樹，脇田隆字：HCV エンベロープタンパク質に付加される N 型糖鎖の機能解析. 第 58 回 日本ウイルス学会学術集会，徳島，2010.11.7-9.
- 41) 政木隆博，松永智子，高橋宏隆，加藤孝宣，宮村達男，遠藤弥重太，澤崎達也，脇田隆字，鈴木哲朗：HCV NS5A 蛋白のリン酸化に関与する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの探索. 第 46 回 日本肝臓学会総会，山形，2010.5.27-28.
- 42) 加藤孝宣，脇田隆字：C 型肝炎ウイルス JFH-1 株の変異と生体内および培養細胞内での増殖能. 第 46 回 日本肝臓学会総会，山形，2010.5.27-28.
- 43) 渡士幸一，下遠野邦忠，Kuan-Teh Jeang，脇田隆字：マイクロ RNA 経路の C 型肝炎ウイルス複製における意義とその創薬標的としての役割. 第 58 回 日本ウイルス学会学術集会，徳島，2010.11.
- 44) 山本真民，相崎英樹，脇田隆字，鈴木哲朗：C 型肝炎ウイルス感染における粒子表面コレステロールの役割. 第 58 回 日本ウイルス学会学術集会，徳島，2010.11.
- 45) 鈴木亮介，斎藤憲司，赤澤大輔，石井孝司，松浦善治（阪大），脇田隆字，鈴木哲朗（浜松医大）：C 型肝炎ウイルスの trans-packaging 型粒子を用いた感染機構の解析. 第 58 回 日本ウイルス学会学術集会，徳島，2010.11.
- 46) 渡邊則幸，村山麻子，Saeed Mohsan，伊達朋子，加藤孝宣，相崎英樹，脇田隆字：HCV エンベロープタンパク質に付加される N 型糖鎖の機能解析. 第 58 回 日本ウイルス学会学術集会，徳島，2010.11.
- 47) Saeed Mohsan，鈴木亮介，渡邊則幸，政木隆博，加藤孝宣，脇田隆字，鈴木哲朗：Role of ERAD pathway in life cycle of hepatitis C virus. 第 58 回 日本ウイルス学会学術集会，徳島，2010.11.
- 48) 安東友美，今村博臣，鈴木亮介，脇田隆字，鈴木哲朗：C 型肝炎ウイルス複製複合体における ATP 制御の可視化と機能解析. 第 58 回 日本ウイルス学会学術集会，徳島，2010.11.
- 49) 鈴木亮介，相崎英樹，脇田隆字，鈴木哲朗：分割ユビキチン法を利用した HCV NS2 と結合する宿主因子の探索およびウイルス粒子形成への関与. 第 33 回 日本分子生物学会年会，神戸，2010.12.
- 50) 松田麻未，李 天成，中西 章，片野晴隆，中村智之，鈴木亮介，畑中研一，脇田隆字，鈴木哲朗：ヒトポリオーマウイルスの糖脂質結合解

- 析とメルケル細胞ポリオーマウイルス感染細胞系の樹立. 第33回日本分子生物学会年会, 神戸, 2010. 12.
- 51) 森山正樹, 赤澤大輔, 横川 寛, 中村紀子, 鈴木哲朗, 石井孝司, 脇田隆宇: 培養細胞由来 HCV 粒子ワクチンの免疫誘導能と最適アジュバントの検討. 第14回日本ワクチン学会学術集会, 東京, 2010. 12. 11-12.
- 52) 渡士幸一: シクロスポリンの抗 HCV 作用, CPCF2010, 名古屋, 2010. 7.
- 53) 相崎英樹, 後藤耕司, 松本喜弘, 山本真民, 佐藤慈子, 高橋信弘, 本島清人, 深澤征義, 花田賢太郎, 松浦善治, 宮村達男, 脇田隆宇, 鈴木哲朗: HCV 粒子形成に関与する脂肪滴周辺膜蛋白の機能解析, 第46回日本肝臓学会総会, 2010. 5.
- 54) 清原知子, 石井孝司, 脇田隆宇: B型肝炎ワクチンの *in vitro* 試験: Inhibition Assay, 第14回日本ワクチン学会, 2010. 12, 東京.
- 55) 森山正樹, 赤澤大輔, 横川 寛, 中村紀子, 鈴木哲朗, 石井孝司, 脇田隆宇: 培養細胞由来 HCV 粒子ワクチンの免疫誘導能と最適アジュバントの検討, 第14回日本ワクチン学会, 2010. 12, 東京.
- 56) 石井孝司, 清原知子, 吉崎佐矢香, 脇田隆宇, 島田智恵, 中村奈緒美, 多田有希, 野田 衛: 2010年に日本で多発したA型肝炎の分子疫学的解析. 第58回日本ウイルス学会, 2010. 11, 徳島.
- 57) 石井孝司, 吉崎佐矢香, 杉山奈央, 加藤孝宣, 李天成, 武田直和, 脇田隆宇: E型肝炎ウイルスの感染性を規定する宿主側因子の探索. 第58回日本ウイルス学会, 2010. 11, 徳島.
- 58) 白土東子, 熊谷安希子, 伊藤浩美, 古川早苗, 成松 久, 石井孝司, 染谷雄一, 脇田隆宇, 久保田智巳: X線結晶構造解析によるノロウイルスと血液型抗原の結合解析. 第58回日本ウイルス学会, 2010. 11, 徳島.
- 59) 鈴木亮介, 斎藤憲司, 赤澤大輔, 石井孝司, 松浦善治, 脇田隆宇, 鈴木哲朗: C型肝炎ウイルスの *trans*-packaging 型粒子を用いた感染機構の解析. 第58回日本ウイルス学会, 2010. 11, 徳島.
- 60) 李 天成, 方 苓, 片岡紀代, 宮村達男, 脇田隆宇: 日本のブタから分離したブタエンテロウイルス 8 の解析. 第58回日本ウイルス学会, 2010. 11, 徳島.
- 61) 李 天成, 方 苓, 網 康至, 須崎百合子, 宮村達男, 武田直和, 脇田隆宇: 不活化 E 型肝炎ワクチンの検討, 第58回日本ウイルス学会, 2010. 11, 徳島.
- 62) 李 天成, 方 苓, 王 澤均, 宋 士利, 片岡紀代, 鈴木哲朗, 脇田隆宇: ヒューマンボカウイルス様粒子の作製およびその応用, 第58回日本ウイルス学会, 2010. 11, 徳島.
- 63) 李 天成, 方 苓, 片岡紀代, 宮村達男, 脇田隆宇: 日本のブタから分離したブタエンテロウイルス 8 の解析, 第150回日本獣医学会学術集会. 2010. 9, 帯広.
- III. その他
- 1) 村上耕介: ノロウイルスの細胞への結合様式の解析. 第1回浜松感染症セミナー, 静岡, 2011. 2.
- 2) 片山和彦: 下痢症ウイルス ノロウイルス. 希少感染症研修会, 2010. 2. 25, 感染研戸山庁舎共用第一会議室.
- 3) 岡智一郎: 下痢症ウイルス サボウイルス. 希少感染症研修会, 2010. 2. 25, 感染研戸山庁舎共用第一会議室.
- 4) 片山和彦: ノロウイルス感染症. 北海道清心会総会平成22年度研修会, 2010. 6. 27, 札幌市.
- 5) 脇田隆宇: C型肝炎ウイルスの複製増殖および持続感染機構. 第23回肝臓フォーラム (東部), 日本工業倶楽部会館, 2010, 6. 5.
- 6) 脇田隆宇: C型肝炎ウイルスの複製増殖および持続感染機構の解析. 第9回KMU研究推進セミナー, 北陸がんブ

ロ教育セミナー，金沢医科大学病院，2010. 6. 18.

- 7) 脇田隆字：C型肝炎ウイルスの複製増殖および持続感染機構の研究. 第17回ソニックフォーラム，ソニックシテイビル，2010. 11. 25.
- 8) 脇田隆字：C型肝炎ウイルスの培養細胞でのウイルス複製と生体における持続感染機構. 京都大学ウイルス研究所 学術講演会，京都大学 京大会館，2010. 7. 15.
- 9) 加藤孝宣：C型肝炎ウイルス JFH-1 株の変異と生体内および培養細胞内での増殖能. 第6回 肝免疫・ウイルスフロンティア，大阪，2010. 4. 17.
- 10) 加藤孝宣：C型肝炎ウイルスの生体内適応変異の解析. 北海道大学遺伝子病制御研究所研究集会「感染・炎症・発癌」，札幌，2010. 12. 20-21.